

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Lucie Halířová

**Metabolické změny v rostlinách rajčete ošetřené
oomycetou *Pythium oligandrum***

Metabolic changes in tomato plants treated
by oomycete *Pythium oligandrum*

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: Doc. RNDr. Helena Ryšlavá, CSc.

Praha, 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne: 15.06.2020

Podpis:
Lucie Halířová

Poděkování:

Ráda bych poděkovala své školitelce a zároveň vedoucí laboratoře paní doc. RNDr. Heleně Ryšlavé, CSc., paní RNDr. Veronice Hýskové, Ph.D. a Mgr. Kateřině Bělonožníkové, za jejich odborné a cenné rady a ochotu kdykoliv pomoci. Poděkování také patří Technologické agentuře ČR za podporu projektu TJ01000451.

Abstrakt

Pythium oligandrum patří mezi unikátní mikroorganismy používané v biologické ochraně rostlin, která je stále častěji využívána v oblasti udržitelného zemědělství. Hledání nových perspektivních kmenů vyžaduje následnou analýzu z hlediska jejich vlivu na rostlinný metabolismus.

V této práci byl sledován vliv moření semen rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L. cv. Micro-Tom) izoláty *Pythium oligandrum* na metabolismus rostlin po vystavení infekci houbovým patogenem *Alternaria brassicicola* s důrazem na antioxidační systém. *Alternaria brassicicola* je nekrotrofní houbový patogen, který způsobuje černou skvrnitost na zemědělských plodinách, zejména z čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*). Rozpoznání patogenu je spojeno s hypersenzitivní reakcí, jejímž základním znakem je tvorba superoxidových radikálů. Reaktivní formy kyslíku fungují v nízkých koncentracích jako signální molekuly, ale ve vysokých poškozují buněčné komponenty a vedou až k apoptóze buňky. K udržení redoxní rovnováhy využívá rostlina systém antioxidačních enzymů a antioxidantů. Aktivita vybraných antioxidačních enzymů katalasy a isoforem superoxiddismutasy byla po infekci patogenem *Alternaria brassicicola* zvýšena. Na druhé straně obsah fenolických látek, které jsou spjaté s antioxidační kapacitou, zůstal nezměněn. Také byla detekována zvýšená aktivita NADP-dependentní malátdehydrogenasy (dekarboxylační) a glukosa-6-fosfátdehydrogenasy, které se podílí na dodávání NADPH pro NADPH oxidasu v rámci hypersenzitivní reakce a pro glutathionreduktasu.

Tato práce byla vytvořena v rámci projektu TAČR TJ01000451.

Klíčová slova

biologická ochrana, *Pythium oligandrum*, *Alternaria brassicicola*, antioxidační systém

Abstract

Pythium oligandrum is one of the unique microorganisms increasingly used in biological plant protection in sustainable agriculture. The search for new promising strains requires subsequent analysis in terms of their effect on plant metabolism.

In this work, the effect of tomato seed treatment (*Solanum lycopersicum* L. cv. Micro-Tom) by *Pythium oligandrum* isolates on plant metabolism after exposure to the fungal pathogen *Alternaria brassicicola* with emphasis on the antioxidant system was studied. *Alternaria brassicicola* is a necrotrophic fungal pathogen that causes black spots on agricultural crops, especially from the *Brassicaceae* family. Pathogen recognition is associated with a hypersensitivity reaction, which features formation of superoxide radicals. Reactive oxygen species function at low concentrations as signalling molecules, but at high concentrations they damage cellular components and lead to cell apoptosis. To maintain redox balance, the plant uses a system of antioxidant enzymes and antioxidants. The activity of selected antioxidant enzymes catalase and superoxide dismutase isoforms was increased after *Alternaria brassicicola* infection. On the other hand, the content of phenolic compounds, which are associated with antioxidant capacity, remained unchanged. The increase in activity of NADP-dependent malate dehydrogenase (decarboxylating) and glucose-6-phosphate dehydrogenase, which are involved in the delivery of NADPH for NADPH oxidase in the hypersensitivity reaction and for glutathione reductase, was also detected.

This work was created within the project TAČR TJ01000451.

Key words

biological control, *Pythium oligandrum*, *A. brassicicola*, antioxidant system

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Teoretická část	2
2.1. Rajče jedlé a jeho produkce ve světě	2
2.2. Patogeny rajčete	3
2.2.1. Rod <i>Alternaria</i>	3
2.2.2. <i>Alternaria brassicicola</i>	5
2.3. Obranné mechanismy rostlin.....	6
2.3.1. Konstitutivní obranný mechanismus rostlin	6
2.3.2. Indukovaný obranný mechanismus	6
2.3.3. Reaktivní formy kyslíku	7
2.3.4. Hypersenzitivní reakce	7
2.3.5. Systémová rezistence.....	7
2.4. Antioxidační systém.....	7
2.4.1. Antioxidační enzymy.....	8
2.4.2. Antioxidanty	9
2.5. Polyfenolické látky.....	9
2.5.1. Flavonoidy	11
2.5.2. Lignin.....	12
2.6. NADP- malátdehydrogenasa dekarboxylační	13
2.7. Glukosa-6-fosfátdehydrogenasa	13
2.8. <i>Pythium oligandrum</i>	14
2.8.1. Priming	14
3. Cíl práce	15
4. Materiál a metody	16
4.1. Chemikálie	16
4.2. Přístrojové vybavení.....	17

4.3.	Rostlinný materiál	17
4.4.	Extrakce.....	17
4.5.	Stanovení koncentrace proteinů	18
4.6.	Stanovení aktivity dehydrogenas	18
4.6.1.	Stanovení aktivity šikimátdehydrogenasy	19
4.6.2.	Stanovení aktivity glukosa-6-fosfátdehydrogenasy.....	19
4.6.3.	Stanovení aktivity NADP- malátdehydrogenasy (dekarboxylační)	19
4.7.	Stanovení aktivity katalasy.....	19
4.8.	Stanovení aktivity glutathionreduktasy	19
4.9.	Stanovení obsahu fenolických látek	19
4.10.	Stanovení antioxidačních vlastností metodou DPPH	20
4.11.	Stanovení antioxidačních vlastností metodou FRAP	21
4.12.	Detekce superoxiddismutasy	22
4.12.1.	Elektroforetická separace za nativních podmínek	22
4.12.2.	Aktivita superoxiddismutasy.....	23
4.12.3.	Inhibice superoxiddismutasy.....	23
5.	Výsledky	24
5.1.	Obsah proteinů v rostlinách rajčete	24
5.2.	Aktivita NADP-dependentních dehydrogenas rostlin rajčat	25
5.2.1.	Aktivita šikimátdehydrogenasy	25
5.2.2.	Aktivita glukosa-6-fosfátdehydrogenasy.....	26
5.2.3.	Aktivita malátdehydrogenasy dekarboxylační	27
5.3.	Obsah fenolických látek a antioxidačních vlastností rostlin rajčete	28
5.4.	Aktivita antioxidačních enzymů v rostlinách rajčat	30
5.4.1.	Aktivita katalasy	30
5.4.2.	Aktivita glutathionreduktasy	31
5.5.	Aktivita superoxiddismutasy	32

6. Diskuze	34
7. Závěr	36
8. Seznam použité literatury.....	37

Seznam zkratek

A Alternaria brassicicola

BSA Hovězí sérový albumin

CAT Katalasa

DPPH 2,2-Difenyl-1-pikrylhydrazyl

FRAP Redukující antioxidační síla

FW Čerstvá hmotnost

G6PDH Glukosa-6-fosfátdehydrogenasa

GR Glutathionreduktasa

GSSG Disodná sůl oxidované formy glutathionu

HEPES Kyselina 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonová

HR Hypersenzitivní reakce

ISR Indukovaná systémová rezistence

NADP Nikotinamidadenindinukleotidfosfát

NADPH Redukovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát

NADP-ME Malátdehydrogenasa dekarboxylační

NBT Nitroblue tetrazolium

PR Proteiny spojené s patogenezí

PVP Polyvinylpyrrolidon

ROS Reaktivní formy kyslíku

SAR Systémově získaná resistance

SDH Šikimátdehydrogenasa

SOD Superoxiddismutasa

TPTZ 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine

1. Úvod

Zvyšování efektivity produkce zemědělských plodin je spojeno s nadměrným používáním pesticidů, které sice účinně hubí škůdce, ale mají řadu vedlejších účinků a velmi často negativně ovlivňují životní prostředí. Z tohoto důvodu se hledají možnosti ochrany rostlin bez nežádoucích vedlejších účinků. Biologická ochrana rostlin využívá přirozených antagonistů rostlinných škůdců. Jedním z výjimečných zástupců biologické ochrany je oomyceta *Pythium oligandrum*, která rostliny nejen chrání před houbovými a bakteriálními patogeny, ale podporuje je i v růstu.

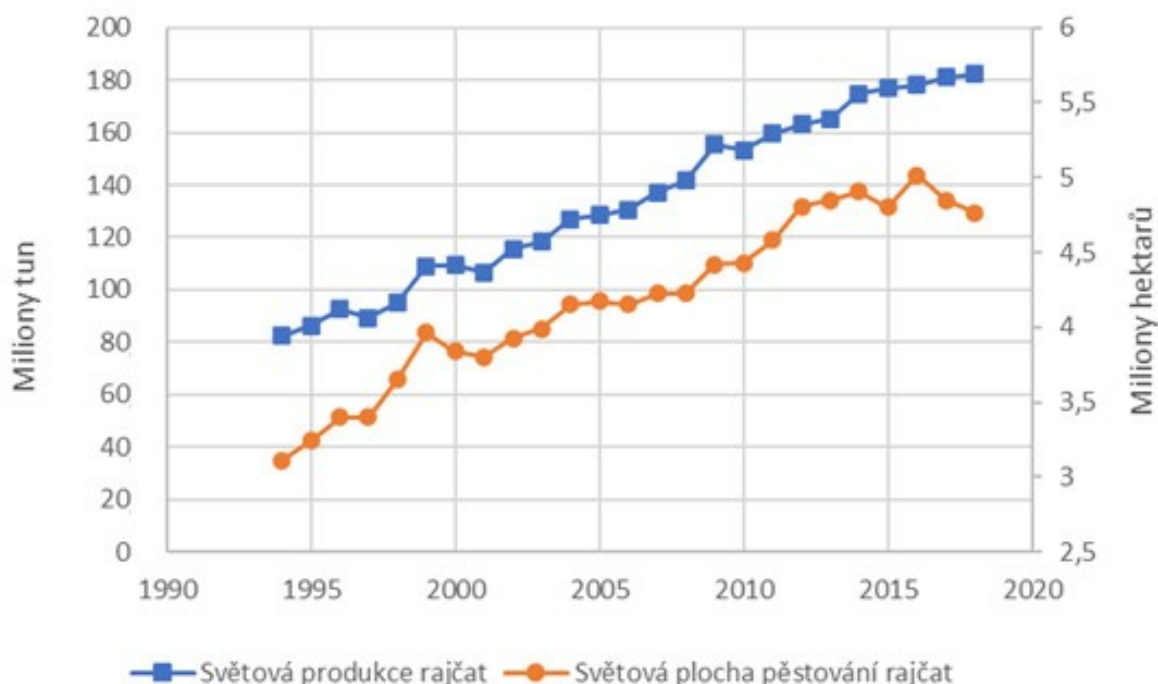
2. Teoretická část

2.1. Rajče jedlé a jeho produkce ve světě

Rajče jedlé, nebo také lilek rajče (*Solanum lycopersicum*) je vytrvalá rostlina bylinného charakteru, která se pěstuje za účelem sklizně bobulových plodů [1]. Není příliš náročná, ale je choulostivá na mráz, a proto se u nás pěstuje buď jako jednoletá rostlina nebo ve sklenících.

Zralé plody rajčete jsou vhodné ke konzumaci, protože obsahují velké množství β -karotenů, vitamíny A, B, C, D, F, K, lykopeny a další antioxidanty [1][2]. Z více než 90 % je tvoří voda, zhruba 4 % sacharidů a kolem 1 % bílkovin. Rajčata jsou také dobrým zdrojem draslíku, hořčíku a dalších minerálních látek. Nezralé plody rajčete obsahují jedovaté alkaloidy jako je solanin, tomatin a tomatidin, které při nadměrném požití dráždí centrální nervový systém [1].

Rajče jedlé pochází ze Střední a Jižní Ameriky, kde bylo objeveno španělskými dobyteli [1]. Do Evropy se rajče rozšířilo v šestnáctém století. Až do devatenáctého století bylo rajče považováno za jedovatou rostlinu (kvůli zeleným částem a nezralým plodům) a bylo využíváno pouze jako okrasná rostlina.



Obr. 1 Vývoj světové produkce rajčat od roku 1994 do roku 2018 [3].

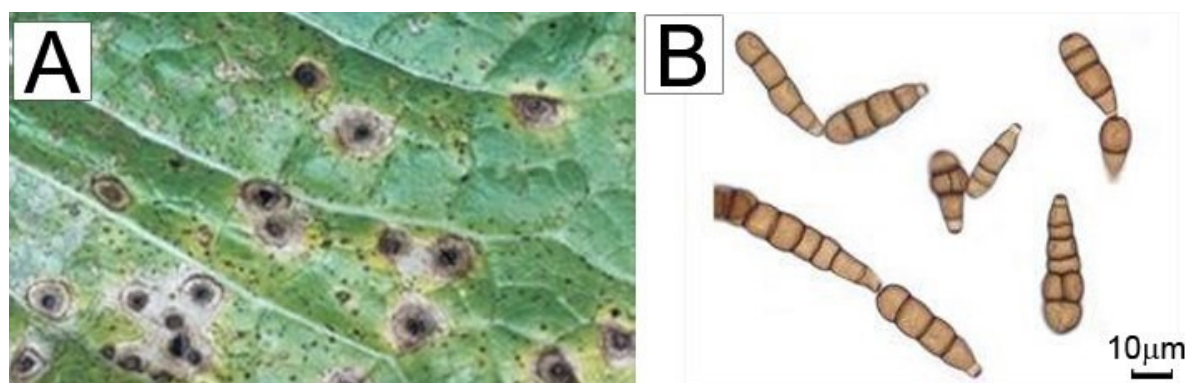
Podle Organizace pro výživu a zemědělství (FAO) bylo v roce 2018 sklizeno 182 milionů tun rajčat (Obr. 1, str. 2) [3]. Z toho největším pěstitelem byla Čína. V České republice bylo pro srovnání v roce 2018 sklizeno 24 tisíc tun rajčat (Tab. 1, str. 2) [4]

Tab. 1 Produkce rajčat v roce 2018 [3][4].

Rajče jedlé (2018)	tisíce tun	Rajče jedlé (2018)	tisíce tun
Čína	35 615	Írán	4 610
USA	12 915	Španělsko	4 102
Indie	11 418	Brazílie	3 594
Turecko	9 961	Mexico	3 002
Egypt	7 327	Česká republika	24
Itálie	6 248	Svět celkem	182 000

2.2. Patogeny rajčete

Jedněmi z hlavní škůdců rajčete jedlého jsou houbové patogeny. Mezi významné choroby způsobené houbovými patogeny rajčete jedlého patří čern rajčatová (původce *Cladosporium fulvum*) [5], padlí rajčete (původce *Oidium lycopersici*) [6] a čern kapustová (*Alternaria brassicicola* (Obr. 2, str. 3)) [7].

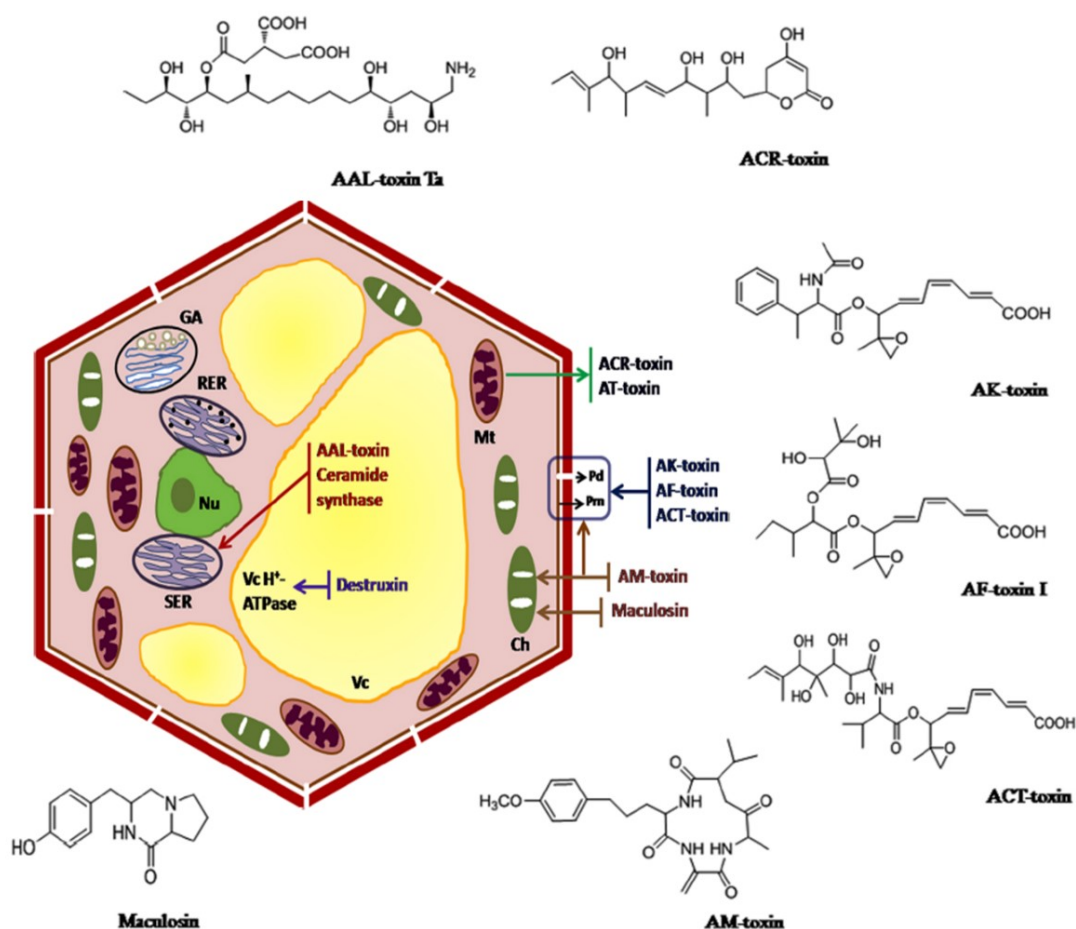


Obr. 2 Čern kapustová -choroba způsobená *A. brassicicola*. A- černá skvrnitost způsobená *A. brassicicola* na listu čínského zelí B-konidie *A. brassicicola* v měřítku 10 µm [7]

2.2.1. Rod *Alternaria*

Rod *Alternaria* je rod hub ascomycet, které jsou známé jako jedny z hlavních rostlinných patogenů [7][8]. V tomto rodu je přes 299 druhů, které jsou součástí fungální flóry a jsou přirozenými dekompostéry a původci rozkladu. Jejich spory jsou přítomné jak v půdě, tak ve vzduchu. Mohou tvořit rozsáhlé kolonie, které jsou obvykle šedé či černé barvy. Zemědělské ztráty způsobené druhy rodu *Alternaria* jsou nejméně 20 %, ale mohou dosahovat i 80 %. Druhy rodu *Alternaria* produkují různé toxické sloučeniny, které mohou u člověka

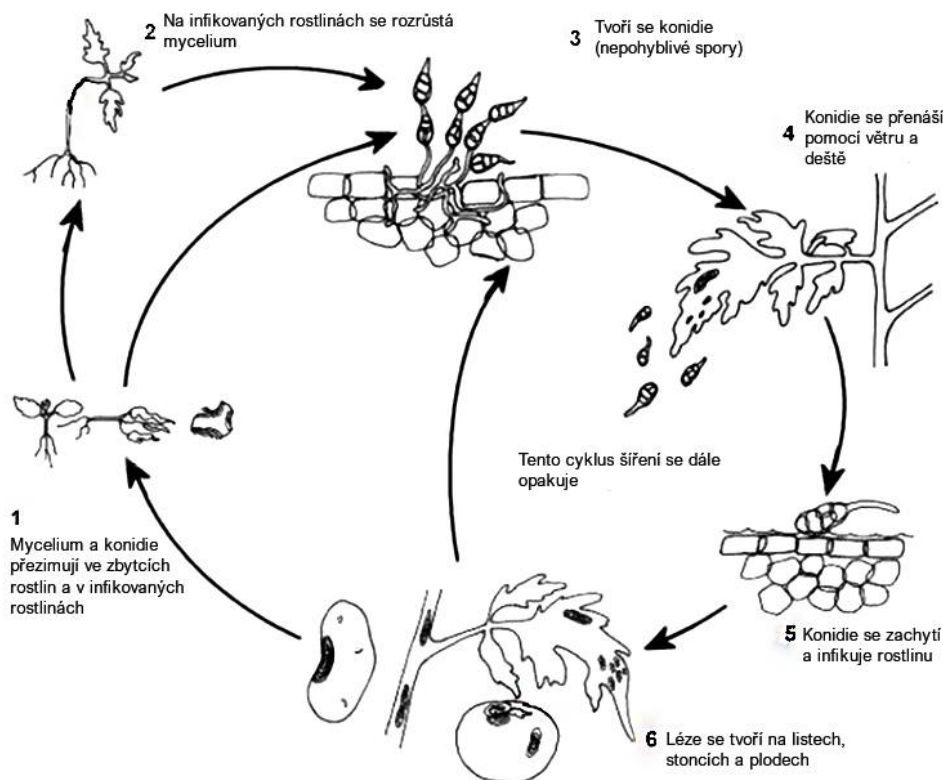
a dalších zvířat způsobovat alergie, hypersenzitivní reakce a mohou vést až k astmatu [9]. Mnoho toxinů je také genotoxických, mutagenních, fetotoxických a teratogenních, proto je jejich přítomnost v hospodářských plodinách nežádoucí a měla by být řádně sledována. Druhy rodu *Alternaria* produkují více než 70 mykotoxinů, z nichž 20 je hostitelsky specifických a ostatní hostitelsky nespecifické [10]. Jedná se jak o nízkomolekulární sekundární metabolity s rozmanitými chemickými strukturami, tak i o peptidy a proteiny. Mykotoxiny rodu *Alternaria* mají negativní vliv na buněčné orgány (Obr. 3, str. 4), u kterých způsobují biochemické i genetické modifikace. Ačkoliv se způsob účinku různých hostitelsky specifických toxinů rodu *Alternaria* liší místem působení, signálními mechanismy i biochemickými reakcemi vedoucími k rostlinnému onemocnění, většina toxinů směřuje k jedinému cíli, kterým je buněčná smrt hostitelské buňky [10]. Většinou se jedná o narušení rovnováhy elektrolytů, poškození plazmatické membrány nebo i endomembránového systému buňky, poškození DNA, narušení oxidativní fosforylace mitochondriálního elektronového transportního řetězce, narušení funkce klíčových enzymů rostliny nebo apoptózu.



Obr. 3 Schématické znázornění cílových míst působení a struktur hostitelsky specifických toxinů v druzích rodu *Alternaria*. Ch: chloroplast, ER: endoplazmatické retikulum, GA: Golgiho aparát, Mt: mitochondrie, Nu: jádro, Pd: plazmodezmy, Pm: plazmatická membrána, Vc: vakuola. Převzato z publikace [10].

2.2.2. *Alternaria brassicicola*

A. brassicicola je houbový patogen, který napadá široké množství hostitelů, zejména z čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*) [12]-[16]. Je považována za nekrotrofní patogen, který způsobuje chorobu jménem čern kapustová. *A. brassicicola* produkuje AB toxin, což je asi 35 kDa protein, jehož mechanismus účinku v hostitelské rostlině dosud není znám. Produkce AB toxinu však souvisí s jeho rozpoznáním oligosacharidem hostitele. [11]. *A. brassicicola* tvoří černé léze se soustřednými kruhy, které se za určitých podmínek (vlhko, teplo) mohou zvětšovat. Léze jsou často obklopené chlorózou (žluté skvrny, viz Obr. 2A, str. 3). V případě, že se tyto léze významně rozšíří, rostlina již není v těchto listech dále schopna fotosyntézy a následuje jejich defoliace (opad listů). To může mít za následek ztrátu vitality nebo úhyn rostliny, a tím snížení zemědělského výnosu až o 50 %. *A. brassicicola* má polycyklický životní cyklus. Reprodukuje se asexuálně za pomoci konidií (Obr. 2B str. 3). *A. brassicicola* je schopná přezimovat ve zbytcích rostlin a divokých rostlinách. Na jaře, poté co se začne oteplovat a je dostatečně vlhko, začne vytvářet konidie (nepohyblivé spory), které se pomocí deště a větru přenesou na neinfikované části či další rostliny. Tyto konidie (nepohyblivé spory) infikují rostlinu přes malé rány, stomata (průduchy na listech) nebo přímo přes epidermální vrstvu. Infekce většinou začíná u starších listů poblíž země. Zde houbový patogen roste a tvoří konidie, které se následně šíří dál a infikují listy, stonky a plody. (viz Obr. 4 str. 5).



Obr. 4 Schéma životního cyklu *A. brassicicola* [16]

2.3. Obranné mechanismy rostlin

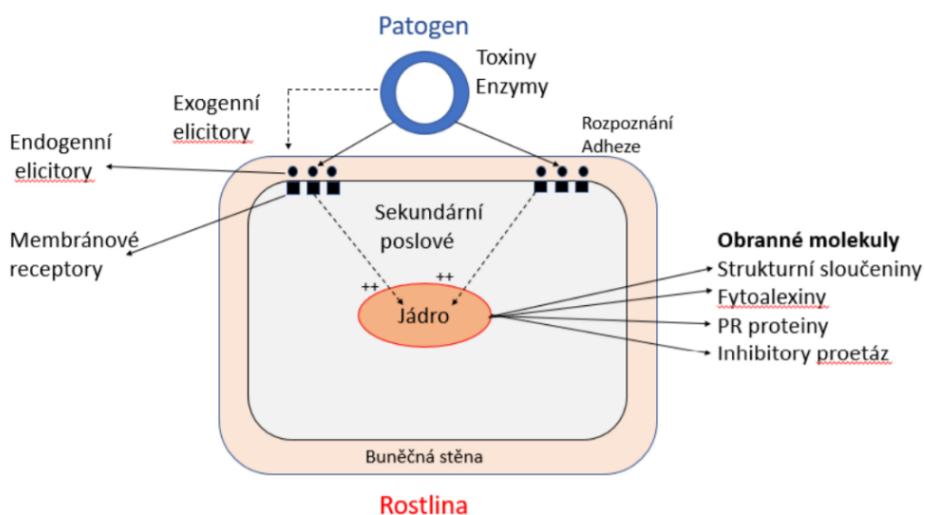
Dojde-li k interakci patogenu s rostlinou, vyvine patogenní organismus infekční tlak a následně může dojít k propuknutí infekce [17]. Rostlina má řadu dalších obranných mechanismů, které se řadí mezi konstitutivní nebo indukované.

2.3.1. Konstitutivní obranný mechanismus rostlin

Konstitutivní obranný mechanismus je pasivní ochrana, která využívá strukturní bariéry [18][19]. Tyto bariéry omezují průnik patogenu do hostitele a jeho případné šíření pomocí voskové kutikuly, buněčné stěny, lignifikace a antimikrobiálních sloučenin (např. esenciální oleje, fenolické látky, alkaloidy, terpenoidy, lektiny polyacetyleny a polypeptidy). Konstitutivní obranné prvky jsou v rostlině neustále přítomny a jsou pro rostlinu energeticky náročné.

2.3.2. Indukovaný obranný mechanismus

Indukovaný obranný mechanismus způsobuje zvýšení obranyschopnosti rostliny vůči vlivu patogenů [20]. Poté co je rostlina napadena patogenem, začne patogen produkovat metabolity (toxiny, enzymy), které uvolní endogenní elicitory (látky produkované hostitelskou buňkou např. fosfolipidy, peptidy, glykoproteiny či oligosacharidy). Endogenní elicitory interagující s membránovým receptorem spustí komplexní kaskádu sekundárních poslů, které do jádra přenesou pokyn k zahájení transkripce genů rezistence (viz Obr. 5, str. 6). Mezi důležité sekundární posly patří kyselina salicylová, kyselina jasmonová, ethylen a reaktivní formy kyslíku.



Obr. 5 Schéma interakce mezi patogenem a rostlinou [20].

2.3.3. Reaktivní formy kyslíku

Reaktivní formy kyslíku (ROS), jako singletový kyslík, superoxid, hydroxylový radikál a peroxid vodíku, vznikají z molekulového kyslíku energetickým či elektronovým přenosem [21].

ROS se tvoří převážně v chloroplastech, mitochondriích a peroxisomech jako vedlejší produkt metabolismu kyslíku [22]. V malém množství fungují jako signální molekuly a podílejí se na homeostázi organismu. Nachází-li se organismus ve stresových podmínkách (sucho, chlad apod.), může se množství ROS navýšit a způsobit tak poškození buněčné struktury, nukleových kyselin, proteinů či lipidů, což může vést až k apoptóze buňky. Aby se tak nestalo, využívá rostlina antioxidační systém, který udržuje redoxní rovnováhu v rostlině.

2.3.4. Hypersenzitivní reakce

Produkce ROS aktivuje hypersenzitivní reakci (HR) [23]. HR je forma programované buněčné smrti, která zapříčiní smrt jak napadených, tak i okolních buněk, čímž omezí šíření patogenu. Poté co se rozpadnou odumřelé buňky, vylije se jejich obsah, který je pro patogen toxický. Navíc se při ochranné nekróze uvolní signální látky, které aktivují obranné mechanismy v dalších okolních buňkách, kde následně dojde ke zvýšené expresi PR genů (genů spojených s patogeny). Průběh HR se však může lišit v závislosti na patogenu a fenotypu hostitele. Následně vzniká systémová rezistence, která zabraňuje dalšímu napadení patogenem.

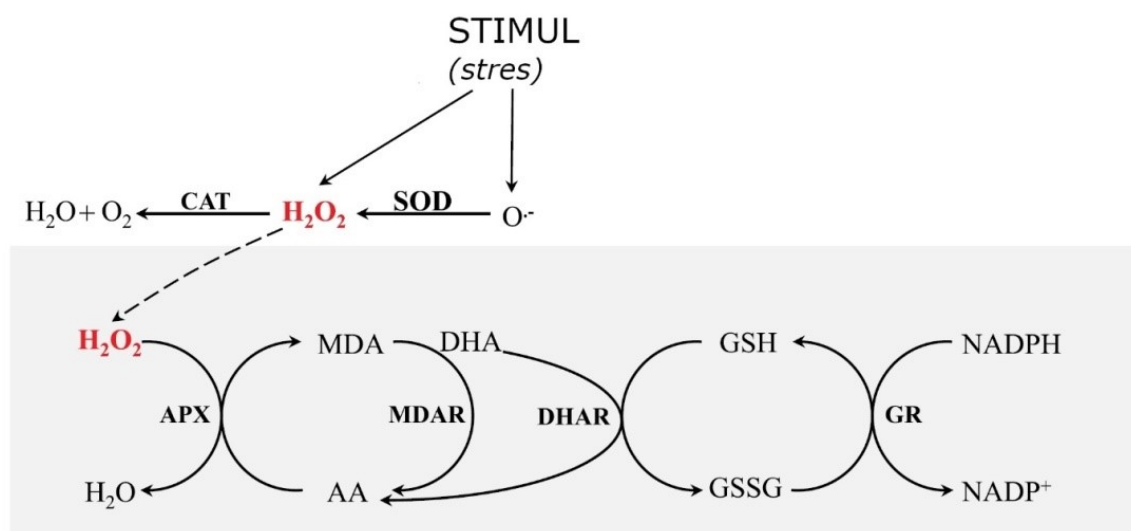
2.3.5. Systémová rezistence

Dalším z typů obranného mechanismu je systémově získaná rezistence (SAR), která může být dočasná, trvalá, a dokonce i dědičná [24][25]. SAR je aktivovaná akumulací kyseliny salicylové a kyseliny pipekolové. Během působení SAR dochází k tvorbě PR proteinů, které navyšují odolnost vůči patogenu. Dalším typem je indukovaná systémová rezistence (ISR), která je aktivovaná kolonizací kořenového systému mikroorganismy. ISR je na úrovni buněk aktivována pomocí signalizačních drah ethylenu a kyseliny jasmonové.

2.4. Antioxidační systém

Biotické a abiotické formy stresu ovlivňují rovnováhu mezi produkcí a detoxikací ROS [26][27]. Do antioxidačního systému lze řadit jednak antioxidační enzymy jako je superoxiddismutasa (SOD, EC 1.15.1.1), askorbátperoxidasa (APX, EC 1.11.1.11),

katalasa (CAT, EC 1.11.1.6), dehydroaskorbátreduktasa (DHAR, EC 1.8.5.1), monodehydroaskorbátreduktasa (MDAR, EC 1.6.5.4), glutathionreduktasa (GR, EC 1.6.4.2) a peroxiredoxiny (Prxs, EC 1.11.1.15), jednak antioxidanty askorbát, glutathion, α -tokoferol a karoteinoidy (Obr. 6, str. 8). Antioxidační enzymy lze rozdělit na primární, které využívají $O_2^{\bullet-}$ a H_2O jako substráty, a na enzymy, které se účastní regenerace redukovaných forem substrátů (resp. koenzymů) a udržují základní redoxní stav buněk.



Obr. 6 Základní komponenty antioxidačního systému [26]. AA, kyselina askorbová (redukováná forma); APX, askorbátperoxidasa; CAT, katalasa; DHA dehydroaskorbát (oxidovaná forma); DHAR dehydroaskorbátreduktasa;; GR, glutathionreduktasa; GSH, glutathion (redukováná forma); GSSG, glutathion (oxidovaná forma); MDA, monodehydroaskorbát; MDAR monodehydroaskorbátreduktasa.

2.4.1. Antioxidační enzymy

Superoxiddismutasa (SOD) se řadí do skupiny metaloenzymů [26]. V rostlinách se vyskytuje ve třech isoformách: Cu/Zn-SOD (mitochondrie, chloroplasty, peroxisomy a cytosol), Fe-SOD (peroxisomy a chloroplasty) a Mn-SOD (mitochondrie). SOD přeměňuje $O_2^{\bullet-}$ na méně toxický H_2O_2 , který je klíčovým metabolitem a signální molekulou během biotického a abiotického stresu.

Katalasa (CAT) je tetramerní enzym obsahující hem jako prosthetickou skupinu [28]. Hlavní funkcí CAT je odstraňování peroxidu vodíku z peroxisomů, kde vzniká během fotorespirace, β -oxidace mastných kyselin a při katabolismu purinu. CAT katalyzuje přeměnu peroxidu vodíku na vodu a kyslík.

Antioxidační enzymy **CAT**, **APX** a **Prxs** zabráňují nadbytečné akumulaci H_2O_2 a s tím spojeného poškození organel a membrán oxidativním stresem [26][27].

Glutathionperoxidasy jsou selen-dependentní cytosolové enzymy, které chrání membrány před jejich lipidovou peroxidací [29]. Glutathionperoxidasy katalyzují redukci peroxidů na alkoholy tak, že přemění redukovanou formu glutathionu (GSH) na oxidovanou formu (GSSG).

Glutathionreduktasa (GR) je flavoenzym, obsahující flavinadenindinukleotid jako svou prostetickou skupinu [30]. Je součástí askorbát-glutathionového cyklu. GR katalyzuje přeměnu oxidované formy glutathionu (GSSG) na redukovanou formu glutathionu (GSH) s NADPH jako koenzymem a udržuje tak v buňkách nadbytek redukované formy glutathionu (GSH).

2.4.2. Antioxidanty

Kyselina askorbová (vitamin C) je jeden z nejsilnějších antioxidantů ve vodném prostředí díky své schopnosti odevzdat elektrony v mnoha reakcích [31]. Kyselina askorbová dokáže přímo zhaset superoxidy, hydroxylové radikály a kyslík v singletovém stavu. Také se podílí na ochraně membrán díky schopnosti regenerace α -tokoferolu z tokoperoxylového radikálu. Dále je důležitá i při fotoprotekci v chloroplastech kde působí jako kofaktor pro violaxantin de-epoxidázy a přispívá tak k rozptylu nadbytečné excitační energie.

α -tokoferol (vitamin E) je antioxidant rozpustný v tucích a je součástí biologických membrán, které chrání před poškozením ROS [32]. Je schopen zabránit lipidové autooxidaci tak, že na povrchu membrány odevzdá atom vodíku lipidovému radikálu a vznikne tokoperoxylový radikál, který může být pak přeměněn zpět jiným antioxidantem.

Glutathion je tripeptid obsahující thiolovou (-SH) skupinu, který se podílí na ochraně buněk před ROS [33]. V buňkách se vyskytuje v redukované formě (GSH), a v oxidované formě (GSSG) s disulfidickou vazbou mezi dvěma molekulami glutathionu. Jeho další schopností je regenerovat ve vodě rozpustné antioxidanty, jako například dehydroaskorbát na kyselinu askorbovou (Obr. 6, str. 8) [26].

2.5. Polyfenolické látky

Polyfenoly představují širokou skupinu látek, jejichž syntéza vychází z šikimátové dráhy (Obr. 7, str. 10) [34][35][36]. Základem této cesty jsou jednoduché látky – fosfoenolpyruvát z glykolýzy a erythrosa-4-fosfát z pentosafosfátové dráhy. Šikimátdehydrogenasa (SDH, EC 1.1.1.25) je klíčový enzym, který katalyzuje redukci 3-dehydrošikimátu na šikimát za přítomnosti koenzymu NADPH. Produkty šikimátové dráhy jsou jednak aminokyseliny fenylalanin, tyrosin a tryptofan, jednak polyfenoly jako fenolické kyseliny, lignany, lignin,

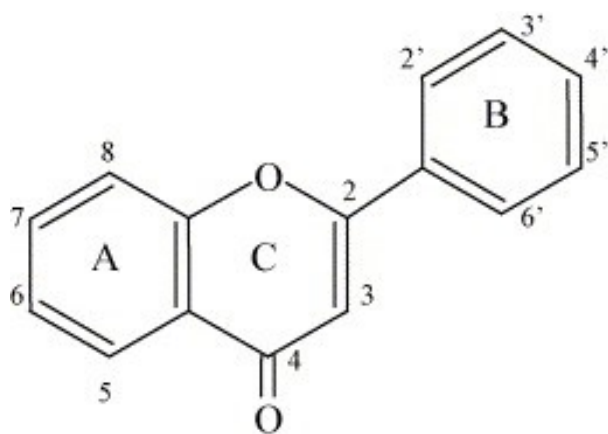
Obr. 7 Šikimátová dráha a fenylpropanoidní cesta [37](upraveno dle Šmeringová, 2014, Hýsková et. al 2020). DHD, 3-dehydrochinátdehydratasa; E4P, D-erythrosa-4-fosfát; PEP, fosfoenolpyruvát; SDH, šikimátdehydrogenasa; R, resveratrol; Q, quercetin; CA, kyselina kávová; FA, kyselina ferulová; SA, kyselina sinapová; UBF, umbeliferon; C, p-kumarylalkohol; CF, coniferylalkohol; S-alkohol, sinapylalkohol



Fenylpropanoidní dráha vytváří velké množství sekundárních metabolitů založených na několika meziproduktech šikimátové dráhy, (například fenylalanin, viz Obr. 7, str. 10) [38]. Centrální fenylpropanoidní cesta je tvořena třemi hlavními enzymatickými aktivitami: (a) deaminace fenylalaninu za pomoci fenylalanin amoniumlyasy (PAL, EC 4.3.124) na amoniak a kyselinu trans-skořicovou, (b) hydroxylace kyseliny trans-skořicové na 4-kumarát působením 4-hydroxylasy kyseliny skořicové (C4H, EC 1.14.14.91) a (c) konverze 4-kumarátu na 4-kumaryl-CoA vlivem 4-kumarát-CoA ligasy (4CL, EC 6.2.1.12). V mnoha případech se geny fenylpropanoidní dráhy vyskytují ve více kopiích a tvoří isoformy těchto enzymů. Isoformy se liší jak lokalizací, tak i aktivitou. Některé z nich se významně podílejí na biosyntéze flavonoidů či tvorbě ligninu. *p*-kumaroylCoA je zásadní meziprodukt ve fenylpropanoidní dráze. Je prekurzor pro tvorbu monolignolu, kumarinu, stilbenu a biosyntézu flavonoidů. Spolupracující enzymy z fenylpropanoidní dráhy jsou uspořádány do komplexů zvaných metabolony [38]. Metabolon popisuje multienzymatické komplexy navázané na buněčné struktury (membrány). Většina metabolonových modelů je založena na dynamické, nekovalentní agregaci složek na povrchu endoplazmatického retikula (ER). Organizace enzymů v metabolonech je způsob, jak buňka dokáže optimalizovat biosyntézu látek. Zajišťuje přímý transport meziproduktů mezi enzymy a navyšuje tak lokální koncentraci okolo enzymově aktivního centra. Také minimalizují vysoce biologicky aktivní a potenciálně toxické meziprodukty. Metabolony sekundárních metabolitů se zdají být dynamické a přechodné v závislosti na širokém spektru stimulů.

2.5.1. Flavonoidy

Flavonoidy jsou fenolické látky izolované z celé řady cévnatých rostlin. Působí v rostlinách jako antioxidanty, antimikrobiální látky, fotoreceptory, atraktory a repelenty [39]. Předpokládá se, že v listech podporují fyziologické přežití, chrání před houbovými patogeny a UV-B zářením [40]. Flavonoidy se také podílí na fotosenzibilaci, přenosu energie, působení rostlinných růstových hormonů a růstových regulátorů, kontrolují fotosyntézu a dýchání, morfogenezi a stanovení pohlaví. Základní strukturní rys flavonoidů je 2-fenyl-benzo [α] pyranové nebo flavonové jádro, které je složeno ze dvou benzenových kruhů (A a B) spojené heterocyklickým pyranovým kruhem (C) (Obr. 8, str. 12).



Obr. 8 Základní struktura flavonoidů s označenými kruhy a očíslovanými pozicemi [40].

Flavonoidy se klasifikují podle biosyntetického původu [40]. Některé třídy, například chalkony, flavanony, flavan-3-oly a flavan-3,4-dioly, jsou meziproducty i konečnými produkty v biosyntéze a mohou se hromadit v rostlinných tkáních. Jiné třídy jako antokyanidy, proantokyanidy, flavony a flavonoly jsou známy pouze jako konečné produkty biosyntézy. Další dvě třídy flavonoidů jsou isoflavony a isoflavonoidy, ve kterých je 2-fenylový postranní řetězec flavanon isomerizován do polohy 3. Neoflavonoid se tvoří další izomerizací do polohy 4.

2.5.2. Lignin

Lignin je po celulóze druhou nejhojnější organickou látkou na Zemi [41]. Vzniká radikálovou polymerací derivátů fenylypropanoidů, a sice polymerací monolignolů (*p*-kumarylalkohol, sinapylalkohol a koniferylalkohol). Syntéza monolignolů vyžaduje redukci karboxylové skupiny příslušných kyselin na alkohol, jedná se o proces závisející na NADPH. Mechanismus vzniku ligninu stále nebyl úplně objasněn. Pravděpodobně se spojování monolignolů účastní jak lakasy, tak peroxidasy. Lakasa je monofenoloxidasou, která oxiduje fenolickou skupinu na radikál a přenáší vodík na molekulární kyslík. V případě peroxidasy, slouží jako oxidant H₂O₂, avšak odkud je H₂O₂ získáván, není zatím jasné. Oxidace fenolu peroxidem vodíku pravděpodobně vede ke vzniku rezonančně stabilního fenolového radikálu. Tyto radikály fenolu mohou neenzymaticky dimerizovat a poté také neenzymaticky polymerizovat. Díky variabilitě rezonančních struktur je možné v polymeru najít mnoho možností. Monolignoly reagují za vzniku několika C-C nebo C-O-C vazeb, čímž vzniká vysoce větvený fenylypropanoidní polymer. Pouze v několika málo postranních řetězcích zůstávají hydroxylové skupiny ligninu volné a mohou být oxidovány na aldehydy a karboxyly. Ačkoliv doposud nebyla primární struktura ligninů úplně objasněna ve všech detailech, je známo, že v jedné buňce se mohou nacházet odlišné struktury uložené v jednotlivých vrstvách

buněčné stěny. Složení ligninu se v různých rostlinách velmi liší. Například lignin jehličnanů obsahuje velké množství koniferolu, zatímco ve stéblech obilovin převládá kumarylový zbytek. V buněčných stěnách je lignin kovalentně vázán na celulosu. Lignifikované buněčné stěny jsou přirovnávané k železobetonu, kde celulosová vlákna představují železné výztuhy a lignin beton. Nejenže lignin poskytuje rostlinným částem jako jsou stonky nebo větvičky mechanickou oporu a je stabilním prvkem pro vaskulární pletiva xylému, tak má i úlohu v obraně rostlin. Svoji mechanickou odolností a chemickým složením je lignin pro býložravce těžko stravitelný. V mnoha rostlinách je lignin syntetizován jako součást obranné reakce vůči poranění. Lignin také inhibuje růst patogenních mikroorganismů. Pouze několik bakterií a hub může lignin štěpit. Speciální úlohu v degradaci ligninu mají dřevokazné houby, které se účastní rozkládání stvolů a kmenů [41].

2.6. NADP-malátdehydrogenasa dekarboxylační

NADP-malátdehydrogenasa dekarboxylační (NADP-ME, EC 1.1.1.40) oxidačně dekarboxyluje malát za spotřeby NADP^+ za vzniku CO_2 , NADPH a pyruvátu v přítomnosti iontu bivalentního kovu (např. Mg^{2+}) [42]. Oxid uhličitý (CO_2) je následně využit při fixaci uhlíku pomocí enzymu Rubisco v C_4 a CAM rostlinách [43]. Také je zapojen do depozice ligninu tím, že poskytuje NADPH, které je využíváno v redukčních krocích při biosyntéze monolignolu. Dále zajišťuje NADPH k biosyntéze flavonoidů, kde je v mnoha krocích zapotřebí redukční síla. Dalším produktem NADP-ME je pyruvát, jenž může být dále využit k získání ATP v mitochondriích, které následně mohou sloužit jako prekurzor fosfoenolpyruvátu (PEP).

2.7. Glukosa-6-fosfátdehydrogenasa

Glukosa-6-fosfátdehydrogenasa (G6PDH, EC 1.1.1.49) je prvním a klíčovým enzymem oxidativní pentosafosfátové dráhy, jejíž rychlost limituje [41][44]. Katalyzuje oxidaci glukosa-6-fosfátu na 6-fosfoglukonolakton za současného vzniku NADPH z NADP^+ . Jedná se o velice rozšířený enzym, který se v rostlinách nachází v cytosolu, plastidech a peroxisomech. Aktivita cytosolové G6PDH je inhibována nadbytkem NADPH. Oproti tomu regulace chloroplastové isoformy je složitější, tato G6PDH je inaktivována světlem prostřednictvím fotoredukovaného thioredoxinu. Při dostatečném zásobení NADPH fotosyntézou, ve dne, je aktivita oxidativního pentosafosfátového cyklu snížena. Naopak v podmínkách potřeby NADPH a ve tmě je aktivita G6PDH a celé dráhy zvyšována přítomností NADP^+ .

Funkcí G6PDH je především poskytování NADPH pro různé biosyntetické a asimilační procesy [41][44][45]. Bylo zjištěno, že se podílí na asimilaci dusíku, rovněž spolu s dalšími enzymy poskytuje intermediáty pro šikimátovou dráhu a biosyntézu nukleových kyselin. G6PDH má důležitou roli v podmínkách rostlinného stresu (především způsobeného zasolením, chladem a těžkými kovy), kdy tento enzym poskytuje NADPH nutný pro antioxidační askorbát-glutathionový cyklus a pro NADPH-oxidasu cytoplazmatické membrány, která produkuje ROS.

2.8. *Pythium oligandrum*

P. oligandrum je mykoparazitická oomyceta, která se vyskytuje v půdě a osidluje rhizosféru (povrch kořenů) rostlin [46]. Poprvé *P. oligandrum* objevil americký mykolog Charles Drechsler v roce 1930, který ho chybně označil jako fytopatogen na kořenech hrachu [47]. *P. oligandrum* je parazit, který napadá a ničí rostlinné patogeny pro svou obživu [48]. Vedle toho má však na rostlinu i pozitivní účinky. *P. oligandrum* indukuje obranný mechanismus rostlin, a tím jim navyšuje schopnost rezistence. Navíc pomáhá chránit rostlinu před biotickým stresem a podporuje ji v růstu.

Další zástupci rodu *Pythium* jsou už řazeny mezi patogeny, napadají širokou škálu organismů od řas (*P. carolinianum*), hmyzu (*P. undulatum*) až po savce (*P. insidiosum*) a rostliny (*P. debaryanum*, *P. aphanidermatum*, *P. ultimum*), u kterých způsobují hnilobu plodů, listů, stonků a kořenů a snižují tak zemědělský výnos [49][50].

2.8.1. Priming

Priming, neboli připravenost, je schopnost rostliny reagovat na stimuly rychlejší a silnější obrannou reakcí. K primingu nemusí docházet pouze po napadení patogenem, ale i stimuly fyzikálními (např. sucho, chlad) a chemickými (např. β -aminobutanová kyselina, benzothiadiazol) [51][52][53]. Výhoda primingu je jeho menší energetická a fyziologická náročnost oproti systémové rezistenci a přímé obraně. *P. oligandrum* sekretuje nízkomolekulární proteiny oligandriny (10 kDa), které v rostlině vyvolávají indukovanou rezistenci bez spuštění hypersenzitivní reakce [54][55]. Genom *P. oligandrum* obsahuje 3 geny kódující oligandriny, označené jako oli-d1, oli-d2 a oli-s1. Proteiny jsou tvořeny sto dvaceti aminokyselinami a jejich sekundární struktura se velmi podobá β -kryptogeinu, β -elicitinu oomycety *Phytophthora cryptogea*.

3. Cíl práce

1. Analyzovat vliv ošetření semen rajčete jedlého izoláty *P. oligandrum* na antioxidační systém po infikování houbovým patogenem *A. brassicicola*.
2. V rámci antioxidačního systému stanovit aktivity katalasy, glutathionreduktasy a superoxiddismutasy včetně antioxidační kapacity.
3. Detekovat aktivitu šikimátdehydrogenasy jako klíčového enzymu syntézy sekundárních metabolitů a stanovit obsah fenolických látek.
4. Stanovit aktivitu NADP-malátdehydrogenasu dekarboxylační a glukosa-6-fosfátdehydrogenasu, které hrají důležitou roli při dodávání NADPH.

4. Materiál a metody

4.1. Chemikálie

• 2,2-Difenyl-1-pikrylhydrazyl	(Sigma-Aldrich, USA)
• 2,4,6-Tripyridyl-s-triazin	(Sigma-Aldrich, USA)
• 2-amino-2-methyl-1-propanol	(Sigma-Aldrich, USA)
• Akrylamid	(Sigma-Aldrich, USA)
• Bisakrylamid	(Sigma-Aldrich, USA)
• Bradfordovo činidlo	(Sigma-Aldrich, USA)
• Bromfenolová modř 0,1%	(Sigma-Aldrich, USA)
• Dihydrát ethylendiamin tetraoctan disodný	(Sigma-Aldrich, USA)
• Dihydrát hydrogenfosforečnanu sodného	(Lachema-Chemapol, ČSSR)
• Dihydrogenfosforečnan draselný	(Lachema-Chemapol, ČSSR)
• Disodná sůl oxidované formy glutathionu	(Roche, Německo)
• 1,4-dithioltreitol	(Sigma-Aldrich, USA)
• Ethanol 96 %	(Lach-Ner, Česko)
• Fenol	(Sigma-Aldrich, USA)
• Folin-Ciocalteuovo fenolové reagens	(Dr. Kulich Pharma, Česko)
• D-Glukosa-6-fosfát	(Sigma-Aldrich, USA)
• Glycerol bezvodý	(Lach-Ner, Česko)
• Glycin	(Lach-Ner, Česko)
• Hexahydrát chloridu hořečnatého	(Sigma-Aldrich, USA)
• Hexahydrát chloridu železitého	(Sigma-Aldrich, USA)
• Hovězí sérový albumin	(Sigma-Aldrich, USA)
• Hydroxid sodný	(Lachema-Chemapol, ČSSR)
• Kyanid draselný	(Sigma-Aldrich, USA)
• Kyselina askorbová	(Sigma-Aldrich, USA)
• Kyselina chlorovodíková 35 %	Lach-Ner, s.r.o., Česká republika
• Kyselina octová 99 %	(Lach-Ner, Česko)
• Kyselina šikimová	(Sigma-Aldrich, USA)
• L-malát sodný	(Sigma-Aldrich, USA)
• Nikotinamidadeninukleotidfosfát	(Roche, Německo)
• Nitroblue tetrazolium	(Sigma-Aldrich, USA)
• Octan sodný krystalický	(Lachema, Česko)
• Peroxid vodíku 30 %	(Lach-Ner, Česko)
• Peroxodisíran amonný	(Sigma-Aldrich, USA)
• Redukovaný nikotinamidadeninukleotidfosfát	(Sigma-Aldrich, USA)
• Riboflavin	(Sigma-Aldrich, USA)
• Sacharosa	(Penta, Česko)
• N,N,N,N-tetramethylethylendiamin	(Thermo, Japonsko)
• Trisma®base (Tris)	(Sigma-Aldrich, USA)
• Trolox	(Sigma-Aldrich, USA)
• Uhličitan sodný bezvodý	(Lachema, Česko)

4.2. Přístrojové vybavení

- | | |
|--|--|
| • Centrifuga Univerzal 32R | (Hettich, Německo) |
| • Analytické váhy Entris® | (Sartorius Lab Instruments, Německo) |
| • Analytické váhy XE-100A | (Denver Instruments Company, USA) |
| • pH metr UltraBasic UB-10 | (Denver Instruments Company, USA) |
| • Spektrofotometr Multiscan go | (Thermo Scientific, USA) |
| • Spektrofotometr Ultrospec 2100 | (Amersham Pharmacia Biotech) |
| • Elektroforetická aparatura Multigel vertikální | (Biometra, Německo) |
| • Prosvěcovací deska Slimlite | (Kaiser, Německo) |
| • Nechlazený inkubátor | (Schoeller Instruments, Česká republika) |

4.3. Rostlinný materiál

Semena rajčete jedlého byla ošetřena mořením přípravkem na bázi oomycety *P. oligandrum*. Byl použit komerčně dostupný izolát M1 a dále dva nové izoláty X42 a 00X48. Rostliny byly pěstované firmou Biopreparáty, spol. s r.o. v organickém substrátu při teplotě $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ s fotoperiodou dvanácti hodin. Po dvou týdnech po vysetí byla polovina rostlin ošetřených *P. oligandrum* infikována fytopatogenní houbou *A. brassicicola*. Čtyři týdny po vysetí byly rostliny sklizeny. Z listů rajčat byly připraveny směsné vzorky o přibližné hmotnosti 0,5 a 1,0 g. Následně byly listy rostlin rajčete zabaleny do alobalu, zmrazeny v kapalném dusíku a uschovány při teplotě -80°C .

4.4. Extrakce

Listy rajčete byly za pomoci tloučku a kapalného dusíku rozdrceny ve třecí misce. Následně byla rostlina homogenizována s extrakční kapalinou dle dané metody stanovení.

Pro stanovení aktivit enzymů byl použit extrakční pufr A (100 mM Tris-HCl pufr pH 7,8; 1 mM DTT; 1 mM EDTA; 5 mM MgCl_2) s výsledným pH 7,8. Objem tohoto pufru byl k drceným listům rajčete přidáván v poměru 1:1 (v/w) na hmotnost vzorku. Nakonec byla k tomuto homogenátu přidána špetka PVP, který na sebe váže polyfenolické látky

V případě stanovení fenolických látek a antioxidační kapacity byl použit 50% (v/v) ethanol v poměru 3:1 (v/w) vůči hmotnosti vzorku.

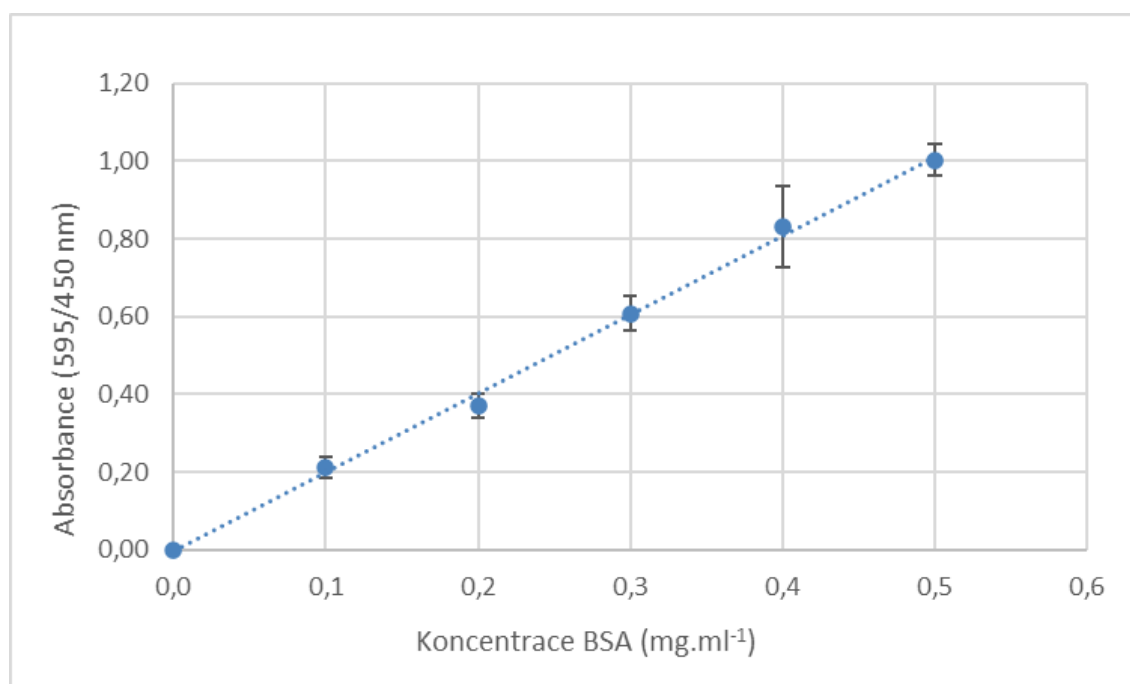
Homogenizovaný rostlinný materiál byl následně extrahován 20 minut při laboratorní teplotě a poté byl centrifugován 15 minut při $16\,600\times g$ a 4°C .

4.5. Stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů byla stanovena dle Bradforda [56]. Tato metoda je založena na vazbě barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 na protein. Tato vazba posunuje absorpční maximum barviva ze 465 na 595 nm.

Do mikrotitrační destičky bylo vždy pipetováno 5 μl vhodně zředěného vzorku (v triplicátech) a poté přidáno 200 μl Bradfordova činidla. Reakční směs se nechala inkubovat 10 minut při laboratorní teplotě. Následně byla proměřena absorbance při 450 nm a při 595 nm. Jako slepý vzorek byl v případě extraktů z listů rajčat použit pufr A (3.4.Extrakce).

Kalibrace pro tuto metodu byla provedena nahrazením roztokem BSA o koncentraci v rozmezí 0,1 – 0,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Obr. 9 str. 18).



Obr. 9: Kalibrace pro stanovení proteinů dle Bradforda – Závislost absorbance (595/450 nm) na koncentraci BSA.

4.6. Stanovení aktivity dehydrogenas

Při stanovení aktivity dehydrogenas byl sledován nárůst absorbance NADPH při 340 nm v plastové kyvetě o délce 1,00 cm a celkovém reakčním objemu 1,00 ml. Reakce byla započata přidáním 50 μl extraktu a sledována po dobu 120 sekund.

4.6.1. Stanovení aktivity šikimátdehydrogenasy

Reakční směs pro stanovení aktivity šikimátdehydrogenasy (SDH, EC 1.1.1.25) se skládala ze 100 mM pufru AMP o pH 9,0; 3 mM šikimátu; 0,2 mM NADP⁺.

4.6.2. Stanovení aktivity glukosa-6-fosfátdehydrogenasy

Reakční směs pro stanovení aktivity glukosa-6-fosfátdehydrogenasy (G6PDH, EC 1.1.1.49) se skládala ze 100 mM pufru Tris-HCl o pH 7,4; 5 mM glukosa-6-fosfát; 2 mM MgCl₂; 0,2 mM NADP⁺.

4.6.3. Stanovení aktivity NADP- malátdehydrogenasy (dekarboxylační)

Reakční směs pro stanovení aktivity NADP dependentní malátdehydrogenasy dekarboxylační (NADP-ME, EC 1.1.1.40) se skládala z 100 mM pufru Tris-HCl o pH 7,4; 10 mM L-malátu; 2 mM MgCl₂; 0,2 mM NADP⁺.

4.7. Stanovení aktivity katalasy

Při stanování aktivity katalasy (CAT, EC 1.11.1.6) byl sledován pokles koncentrace peroxidu vodíku (H₂O₂) v reakční směsi při 240 nm v křemenné kyvetě o délce 1,00 cm a celkovém reakčním objemu 3,00 ml. Reakční směs se skládala z 50 mM fosfátového pufru o pH 7,0; deionizované vody a 20 mM H₂O₂ a 100 µl vhodně zředěného extraktu. Po přidání extraktu reakce započala a byla sledována po dobu 60 sekund.

4.8. Stanovení aktivity glutathionreduktasy

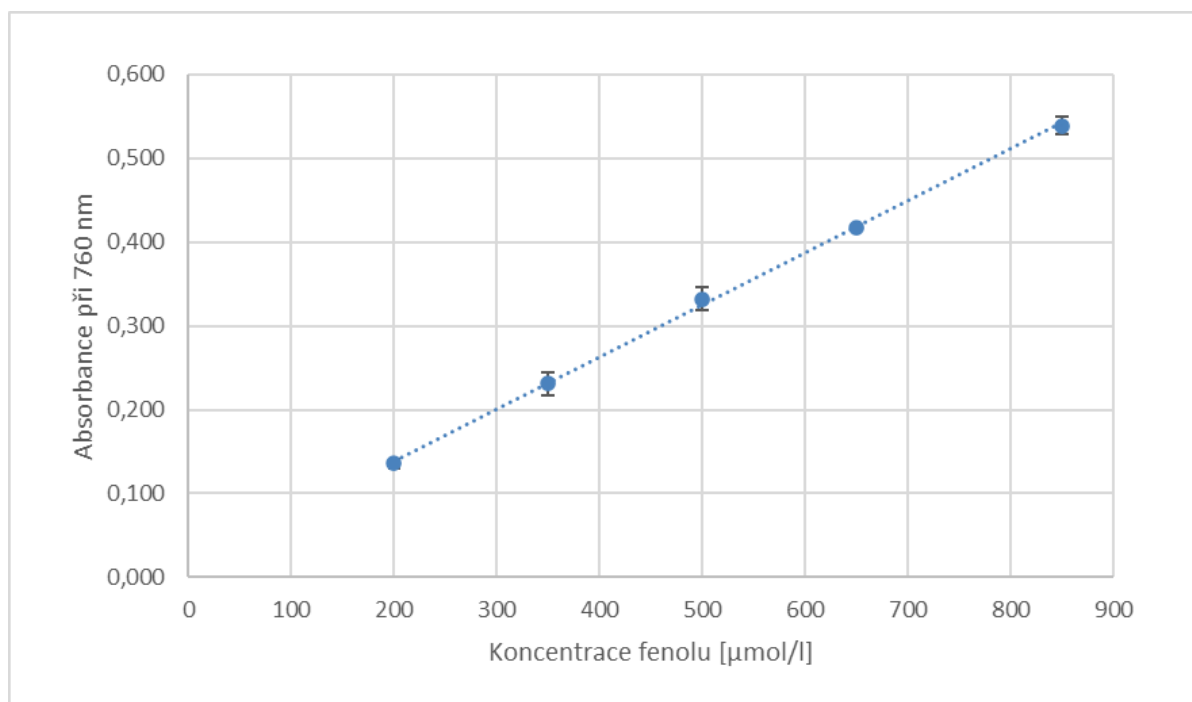
Aktivita glutathionreduktasy (GR, EC 1.6.4.2) byla stanovena tak, že byl sledován pokles koncentrace NADPH v reakční směsi při 340 nm v kyvetě o délce 1,00 cm a celkovém reakčním objemu 3,00 ml. Reakční směs se skládala z 100 mM pufru Tris-HCl o pH 8,0; 1 mM EDTA; 1,3 mM GSSG; 0,1 mM NADPH; 100 µl extraktu. Reakce byla započata přidáním 100 µl extraktu a sledována po dobu 180 sekund.

4.9. Stanovení obsahu fenolických látek

Obsah fenolických látek byl stanoven za pomoci mikrotitrační destičky, do které bylo pipetováno 20 µl vhodně zředěného vzorku (v triplikátech), a pak bylo přidáno 100 µl 10% (v/v) Folin-Ciocalteuova činidla. Poté byla směs 2 minuty inkubována při laboratorní

teplotě. Následně bylo přidáno 80 μl 75 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (w/v) Na_2CO_3 . Po 30 minutách inkubace při laboratorní teplotě byla změřena absorbance při 760 nm.

Kalibrace pro tuto metodu byla provedena záměnou extraktu za roztok fenolu o koncentraci v rozmezí 200 – 850 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Obr. 10, str. 20).



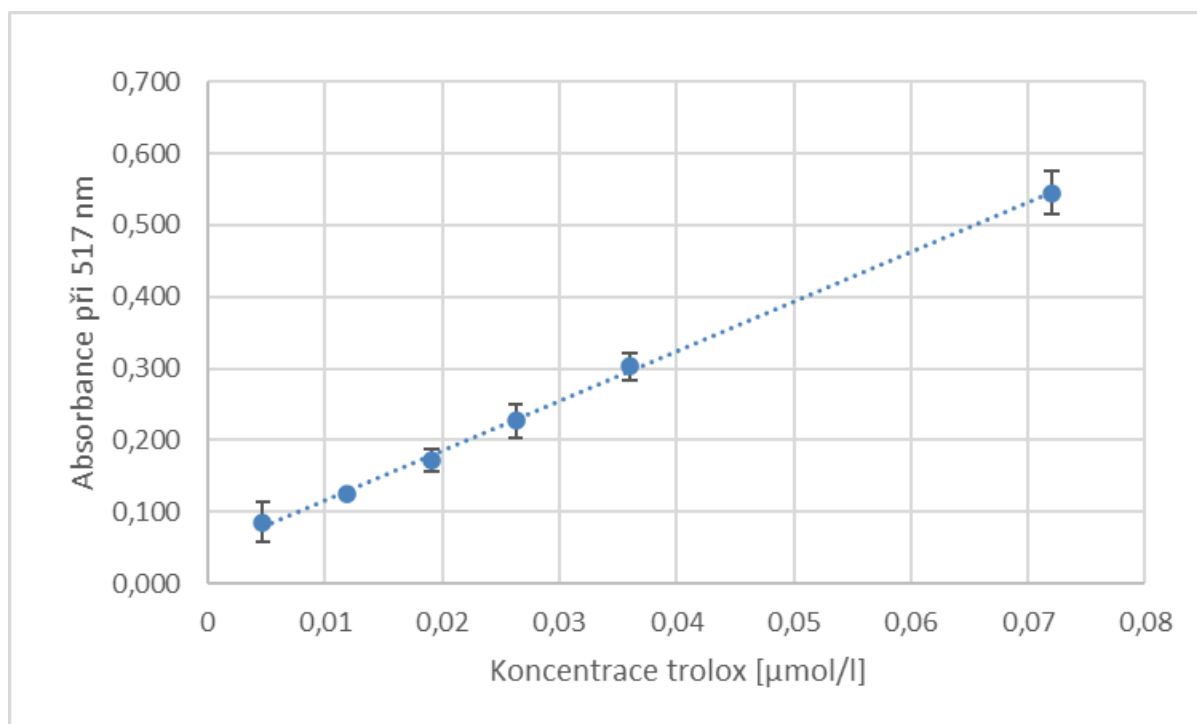
Obr. 10: Kalibrace pro stanovení obsahu fenolických látek. Závislost absorbance (760 nm) na koncentraci fenolu.

4.10. Stanovení antioxidačních vlastností metodou DPPH

Metodou DPPH se stanovuje schopnost rostlinného extraktu eliminovat syntetický volný radikál 2,2-difeny-1-pikrylhydrazil (DPPH). Tento volný radikál má tmavě modrou barvu (fialovou) a má absorpční maximum při 517 nm a měří se ztráta této barvy – jeho zhášení.

Do mikrotitrační destičky bylo pipetováno 100 μl 96% ethanolu, 50 μl vhodně zředěného vzorku a poté bylo přidáno 50 μl roztoku DPPH (400 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ v 96% ethanolu). Roztok DPPH byl vždy připraven čerstvý a chráněn před světlem alobalem. Do slepého vzorku bylo pipetováno 150 μl 96% ethanolu a 50 μl 50% ethanol. Do reference bylo pipetováno 100 μl 96% ethanolu, 50 μl 50% ethanol a 50 μl roztoku DPPH. Po 10 minutách inkubace při laboratorní teplotě byla změřena absorbance při 517 nm.

Kalibrace pro tuto metodu byla provedena záměnou extraktu za roztok troloxu v 50% ethanolu o koncentraci v rozmezí 20 – 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Obr. 11, str. 21).



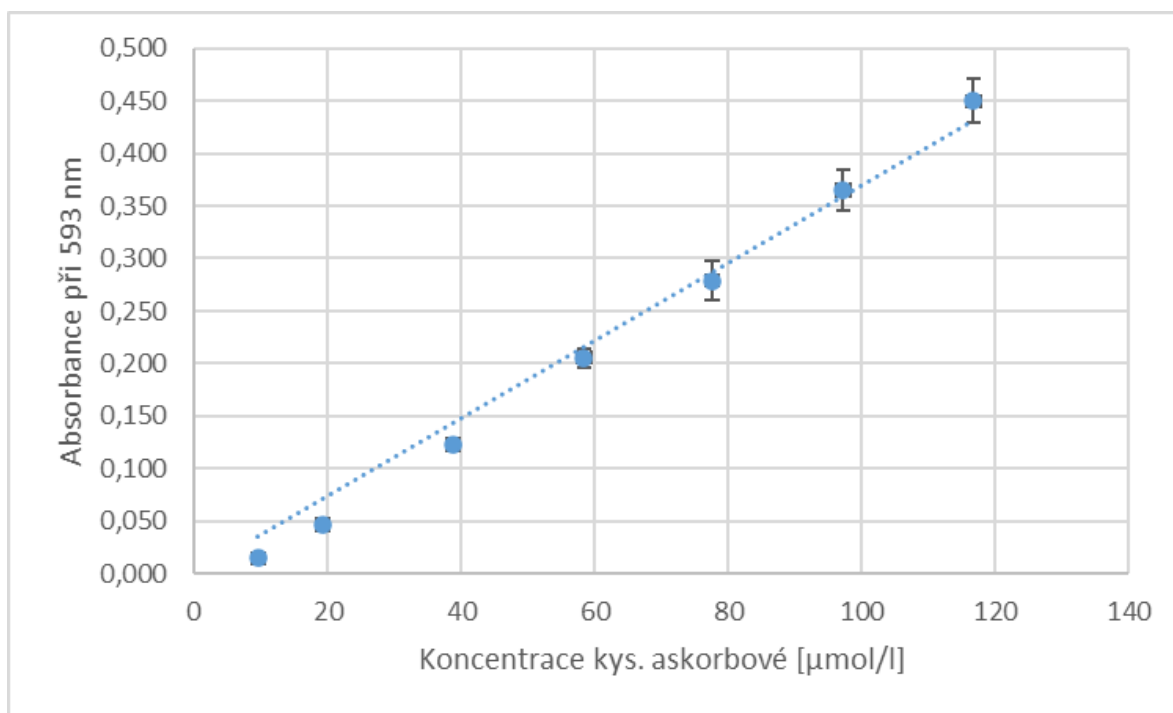
Obr. 11: Kalibrace pro stanovení antioxidačních vlastností metodou DPPH. Závislost absorbance radikálu DPPH (517 nm) na koncentraci troloxu v 50% ethanolu

4.11. Stanovení antioxidačních vlastností metodou FRAP

Metoda FRAP je založena na schopnosti rostlinného extraktu redukovat železitý iont (Fe^{3+}) a 2,4,6-tripirydyl-s-triazine (TPTZ) na železnatý komplex $[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]^{2+}$. Tato změna je doprovázena změnou barvy na intenzivní modrou s absorpčním maximem při 593 nm.

Antioxidační vlastnosti byly stanoveny za pomoci mikrotitrační destičky, do které bylo pipetováno 40 μl vhodně ředěného extraktu a následně přidáno 200 μl FRAP činidla. FRAP činidlo tvořilo 700 $\mu\text{mol/l}$ TPTZ ve 40 mM HCl, 20 mM FeCl_3 a 300 mM acetátový pufr pH 3,6. Toto činidlo se připravovalo vždy čerstvé a bylo chráněno před světlem. Po 10 minutách inkubace byla změřena absorbance při 593 nm.

Kalibrace pro tuto metodu byla provedena záměnou extraktu za roztok kyseliny askorbové o koncentraci v rozmezí 10 – 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. (Obr. 12, str. 22)



Obr. 12: Kalibrace pro stanovení antioxidačních vlastností metodou FRAP. Závislost absorbance redukovaného Fe komplexu (593 nm) na koncentraci kys. askorbové.

4.12. Detekce superoxiddismutasy

Superoxiddismutasa je enzym zodpovědný za katalýzu přeměny peroxidového radikálu O_2^-/HO_2 na peroxid vodíku H_2O_2 , a tím regulovat redoxní stav buněk.

4.12.1. Elektroforetická separace za nativních podmínek

Elektroforetická separace za nativních podmínek je metoda, která se využívá k detekci proteinů v nedenaturovaném stavu.

Separační gel (10%) byl připraven v objemu 15 ml, který tvořilo 5,9 ml deionizované vody, 5,0 ml 30% akrylamidové směsi, 3,8 ml 1,5 M Tris-HCl pufru (pH 8,8), 0,15 ml 10% glycerolu a 0,15 ml 10% peroxodisíranu amonného a 4 μl TEMED.

Zaostřovací gel (5%) byl připraven v objemu 4 ml, který tvořilo 2,7 ml deionizované vody, 0,67 ml 30% akrylamidové směsi, 0,5 ml 1,0 M Tris-HCl pufru (pH 6,8), 40 μl 10% glycerol, 40 μl 10% peroxodisíranu amonného a 4 μl TEMED.

Gely byly vrstveny do vertikálních skel o rozměrech 11 cm (šířka) x 7 cm (délka) s hřebenem s počtem 12 jamek.

Elektrodový pufr byl připraven na objem 1 litru, který tvořilo 18,8 g glycinu, 3 g Tris a 10 ml 10% glycerolu, pH 8,3.

K extraktům byla přidána sacharóza, aby vznikl 20% (w/v) roztok. Tyto extrakty byly následně nanášeny do jamek, které měly objem 25 μ l. Poté byla do vrchní části elektrodové aparatury pipetováno 150 μ l 0,1 % (w/w) bromfenolové modři, pomocí které se sledoval postup elektroforézy. Počáteční napětí na zaostření bylo 70 V a poté na separaci bylo napětí navýšeno na 140 V.

4.12.2. Aktivita superoxiddismutasy

Pomocí elektroforetické separace za nativních podmínek byly isoenzymy superoxiddismutasy (SOD, EC 1.15.1.1) separovány a následně 20 minut inkubovány v reakční směsi v inkubátoru při 37 °C a bez přístupu světla. Reakční směs tvořila 1,5 mM EDTA, 70 mM KH_2PO_4 , 6mM riboflavin, 0,47% (v/v) TEMED a 0,3% (w/v) NBT.

Gel byl následně promyt deionizovanou vodou a ponechán v tenké vrstvě se vyvíjet 15 minut pod 9 W zářivku. Tam kde neproběhla reakce se superoxiddismutasou, tam došlo k fotoreakci NBT za vzniku nerozpustného modrého formazanu.

4.12.3. Inhibice superoxiddismutasy

Po elektroforetické separaci za nativních podmínek, kde byly isoenzymy superoxiddismutasy separovány byly následně 30 minut inkubovány v inhibiční směsi v inkubátoru při 37 °C a bez přístupu světla. Poté byl gel promyt deionizovanou vodou a vložen do reakční směsi. Následně se postupovalo jako v předchozí kapitole (4.12.2. Aktivita superoxiddismutasy).

Inhibiční směs s peroxidem vodíku H_2O_2 inhibuje Fe-SOD a inaktivuje Cu/Zn-SOD. Její složení bylo 50 mM KH_2PO_4 , 1 mM EDTA a 5 mM H_2O_2 .

Inhibiční směs s kyanidem draselným KCN inhibuje Cu/Zn-SOD. Inhibiční roztok obsahoval 50 mM KH_2PO_4 , 1 mM EDTA a 2 mM KCN.

Mn-SOD nebylo inhibováno ani jednou z inhibičních směsí.

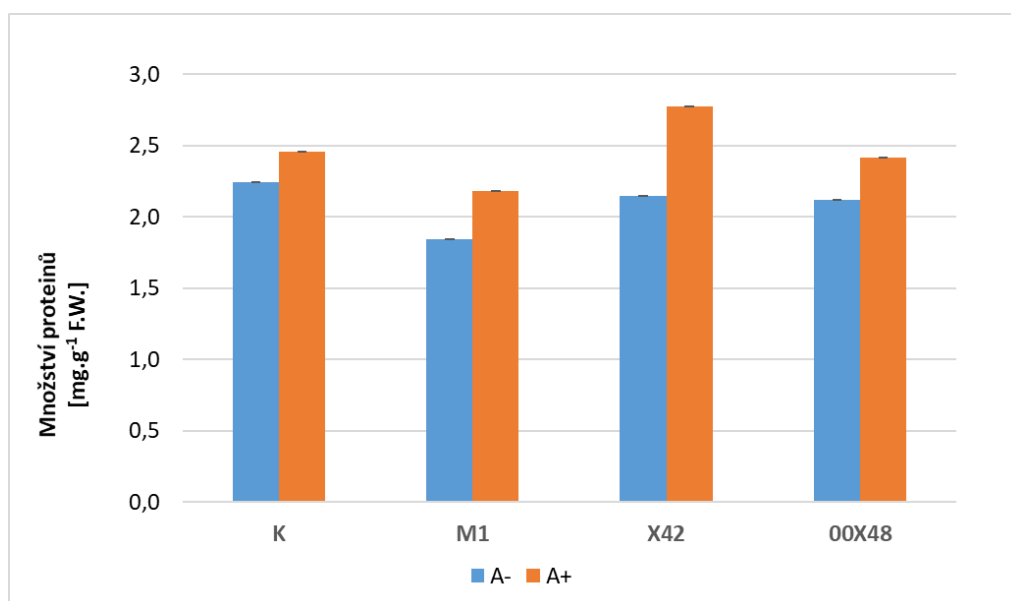
5. Výsledky

Semena rajčete jedlého byla ošetřena mořením přípravkem na bázi izolátů *P. oligandrum*. Byl použit komerčně dostupný izolát M1 a dále dva nové izoláty X42 a 00X48 získané v rámci projektu TAČR (TJ01000451). Rostliny byly poté infikovány fytopatogenní houbou *A. brassicicola*. V extraktech z listů těchto rostlin byly sledovány biochemické charakteristiky související se stresem rostlin, obsah fenolických látek, antioxidační kapacita a aktivita vybraných NADP dependentních a antioxidačních enzymů.

5.1. Obsah proteinů v rostlinách rajčete

Obsah rozpustných proteinů v extraktech listů rostlin rajčete byl stanoven pomocí metody dle Bradforda [56].

Na obrázku 13 pozorujeme, že rostliny ošetřené izoláty X42 (A-) a 00X48 (A-) obsahovaly srovnatelné množství rozpustných proteinů jako rostliny bez ošetření *P. oligandrum*. K (A-). Rostliny ošetřené izolátem M1 (A-), vykazovaly vůči rostlinám bez ošetření K (A-) o 18 % nižší množství rozpustných proteinů. Rostliny infikované patogenem *A. brassicicola* (A+) měly vždy vyšší obsah rozpustných proteinů oproti rostlinám neinfikovaným patogenem (A-). Největší množství rozpustných proteinů obsahovaly rostliny ošetřené izolátem X42 (A+), které obsahovaly o 29 % vyšší množství proteinů oproti neinfikovaným rostlinám ošetřených izolátem X42 (A-).



Obr. 13 Množství rozpustných proteinů rostlin rajčat, které byly ošetřeny *P. oligandrum* a rostlin rajčat ošetřených *P. oligandrum* a následně infikované *A. brassicicola*. Vztaheno na 1 g čerstvé hmotnosti (F.W.) Modré sloupce (A-) ■ – rostliny pouze ošetřené *P. oligandrum*; Oranžové sloupce (A+) ■ – rostliny ošetřené *P. oligandrum* a infikované *A. brassicicola*. K - bez ošetření *P. oligandrum*; M1 – komerčně dostupný izolát *P. oligandrum*; X42 – nový izolát *P. oligandrum*; 00X48 – nový izolát *P. oligandrum*.

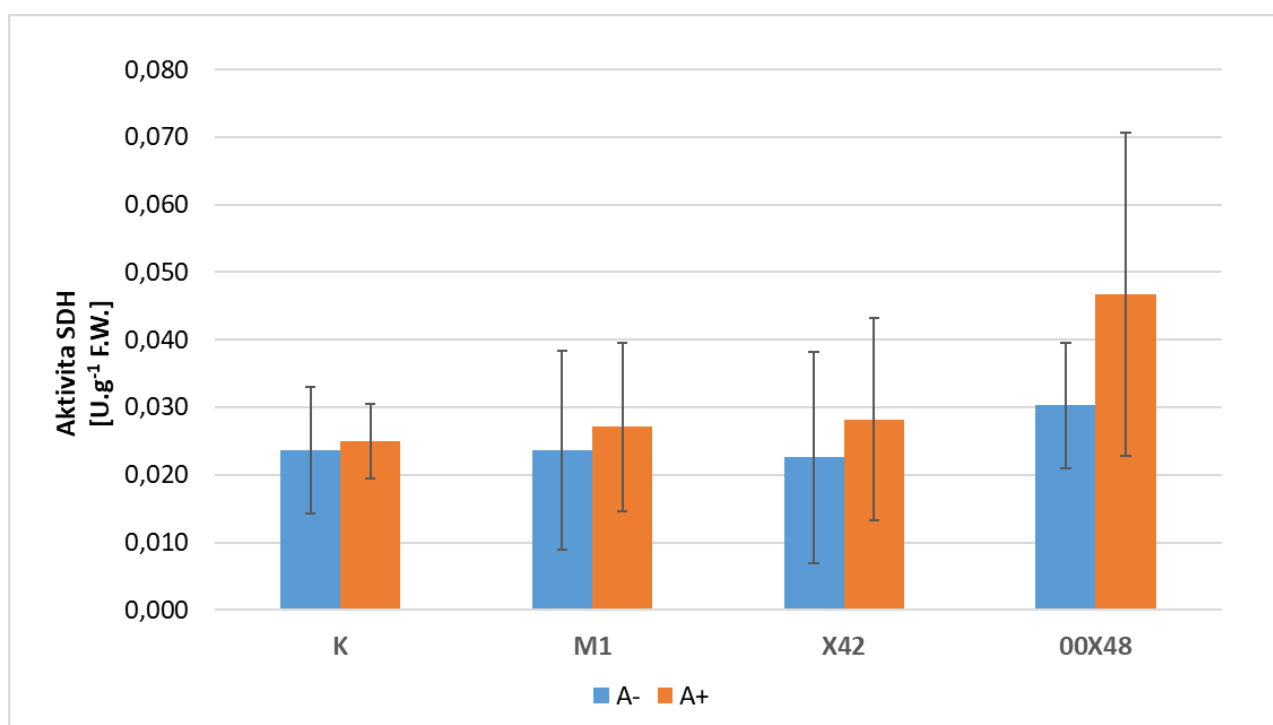
5.2. Aktivita NADP-dependentních dehydrogenas rostlin rajčat

V extraktech rostlin rajčete byla stanovena aktivita dehydrogenas, které využívají NADP^+ jako koenzym.

5.2.1. Aktivita šikimátdehydrogenasy

Z obrázku 14 je patrné, že rostliny ošetřené izoláty M1 (A-) a X42 (A-) vykazovaly srovnatelnou aktivitu SDH jako rostliny bez ošetření K (A-). Rostliny ošetřené izolátem 00X48 (A-) měly aktivitu SDH o 25 % vyšší oproti rostlinám bez ošetření K (A-).

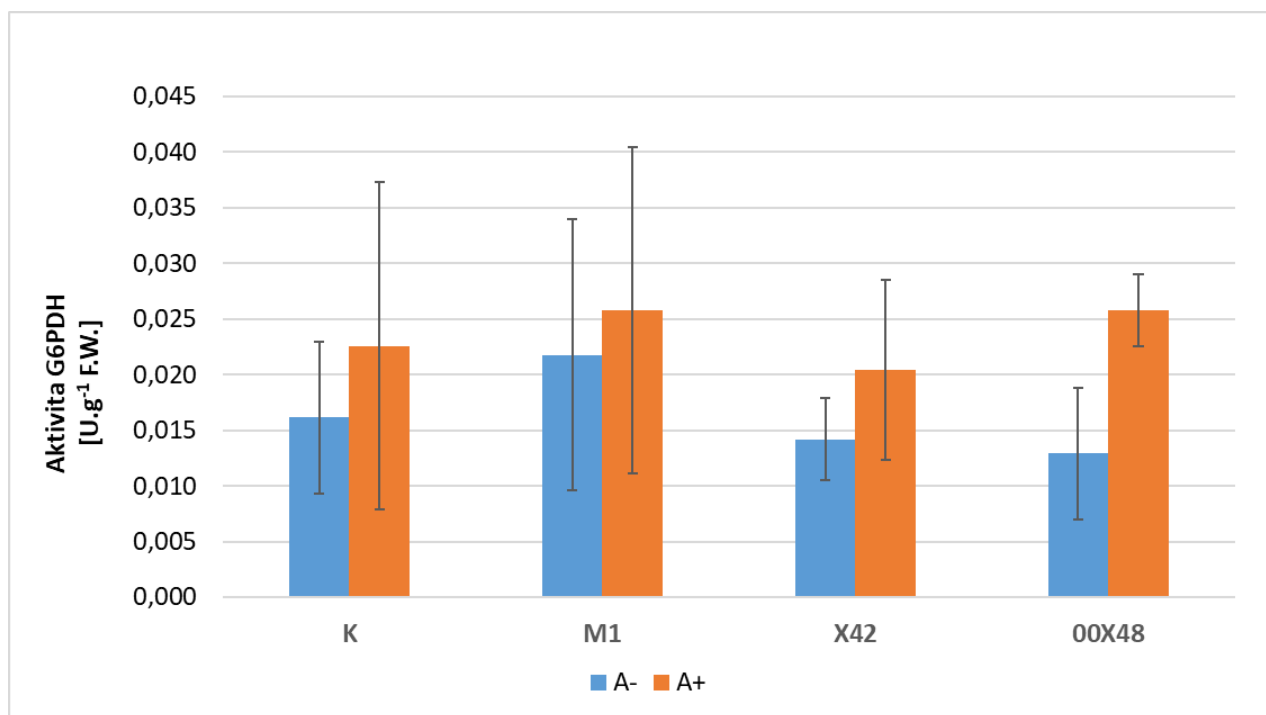
Všechny rostliny infikované *A. brassicicola* (A+) vykazovaly vyšší aktivitu SDH než izoláty z rostlin neinfikovaných (A-). Nejvýraznější nárůst aktivity SDH byl zaznamenán u rostlin ošetřených izolátem 00X48 (A+), který narostl o 57 % oproti neinfikovaným rostlinám ošetřených izolátem 00X48 (A-).



Obr. 14 Aktivita SDH u rostlin rajčat, které byly ošetřeny *P. oligandrum* a rostlin rajčat ošetřených *P. oligandrum* a následně infikované *A. brassicicola*. Vztaženo na 1g čerstvé hmotnosti listů (F.W.). Modré sloupce (A-) ■ – rostliny pouze ošetřené *P. oligandrum*; Oranžové sloupce (A+) ■ – rostliny ošetřené *P. oligandrum* a infikované *A. brassicicola*; K - bez ošetření *P. oligandrum*; M1 – komerčně dostupný izolát *P. oligandrum*; X42 – nový izolát *P. oligandrum*; 00X48 – nový izolát *P.o*

5.2.2. Aktivita glukosa-6-fosfátdehydrogenasy

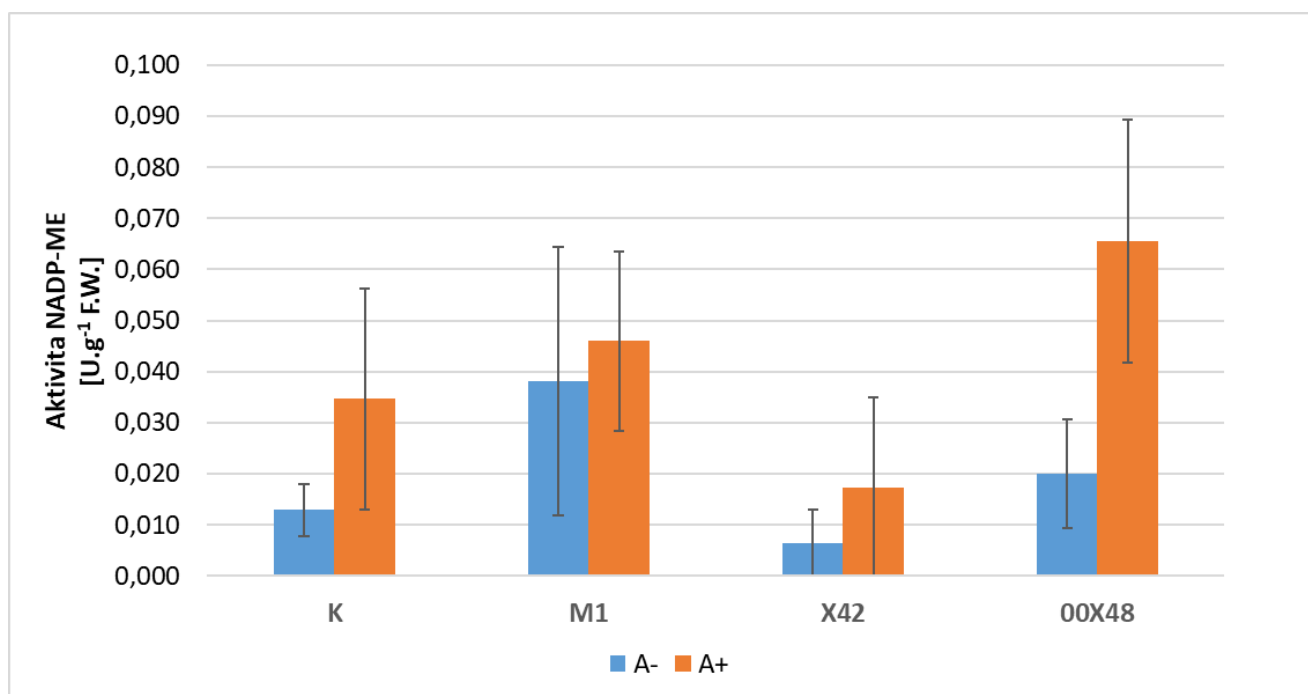
Na obrázku 14 pozorujeme u rostlin ošetřených izolátem M1 (A-) vyšší aktivitu G6PDH o 38 % oproti rostlinám bez ošetření K (A-). Zatímco u rostlin ošetřených izolátem 00X48 (A-) byly hodnoty G6PDH o 31 % nižší než u rostlin bez ošetření K (A-). Rostliny ošetřené izolátem X42 (A-) měly srovnatelnou hodnotu aktivity G6PDH jako rostliny bez ošetření K (A-). Všechny rostliny infikované *A. brassicicola* (A+) vykazovaly vyšší aktivity G6PDH než neinfikované rostliny (A-). Největší nárůst aktivity G6PDH je patrný u infikovaných rostlin ošetřených izolátem 00X48 (A+), který se zvýšil oproti neinfikovaným rostlinám ošetřených izolátem 00X48 (A-) o 100 %. U infikovaných rostlin bez ošetření K (A+) došlo k nárůstu aktivity G6PDH o 43 % vůči neinfikovaným rostlinám bez ošetření K (A-). Nárůst aktivity G6PDH o 43 % byl zaznamenán i u infikovaných rostlin ošetřených izolátem X42 (A+) oproti neinfikovaným rostlinám ošetřených izolátem X42 (A-). U infikovaných rostlin ošetřených izolátem M1 (A+) došlo k nárůstu aktivity G6PDH o 18 % oproti neinfikovaným rostlinám ošetřených izolátem M1 (A-).



Obr. 15 Aktivita G6PDH u rostlin rajčat, které byly ošetřeny *P. oligandrum* a rostlin rajčat ošetřených *P. oligandrum* a následně infikované *A. brassicicola*. Vztaženo na 1g čerstvé hmotnosti listů (F.W.). Modré sloupce (A-) – rostliny pouze ošetřené *P. oligandrum*; Oranžové sloupce (A+) – rostliny ošetřené *P. oligandrum* a infikované *A. brassicicola*; K - bez ošetření *P. oligandrum*; M1 – komerčně dostupný izolát *P. oligandrum*; X42 – nový izolát *P. oligandrum*; 00X48 – nový izolát *P. oligandrum*

5.2.3. Aktivita malátdehydrogenasy dekarboxylační

Na obrázku 16 je patrné, že u rostlin pouze ošetřených *P. oligandrum* vykazovaly nejvyšší aktivitu NADP-ME rostliny ošetřené izolátem M1 (A-), které měly o 192 % vyšší aktivitu než rostliny bez ošetření K (A-). Rostliny ošetřené izolátem 00X48 (A-) měly vyšší hodnotu o 54 % než rostliny bez ošetření K (A-). Nejnížší hodnotu měly rostliny ošetřené izolátem X42 (A-), které byly o 54 % nižší než u rostlin bez ošetření K (A-). Všechny rostliny infikované *A. brassicicola* (A+) vykazovaly vyšší aktivitu NADP-ME než neinfikované rostliny ošetřené izoláty *P. oligandrum* (A-). Nejvyšší aktivitu NADP-ME měly rostliny ošetřené izolátem 00X48 (A+), u kterého byl nárůst aktivity NADP-ME o 230 % oproti neinfikovaným rostlinám ošetřených izolátem 00X48 (A-).

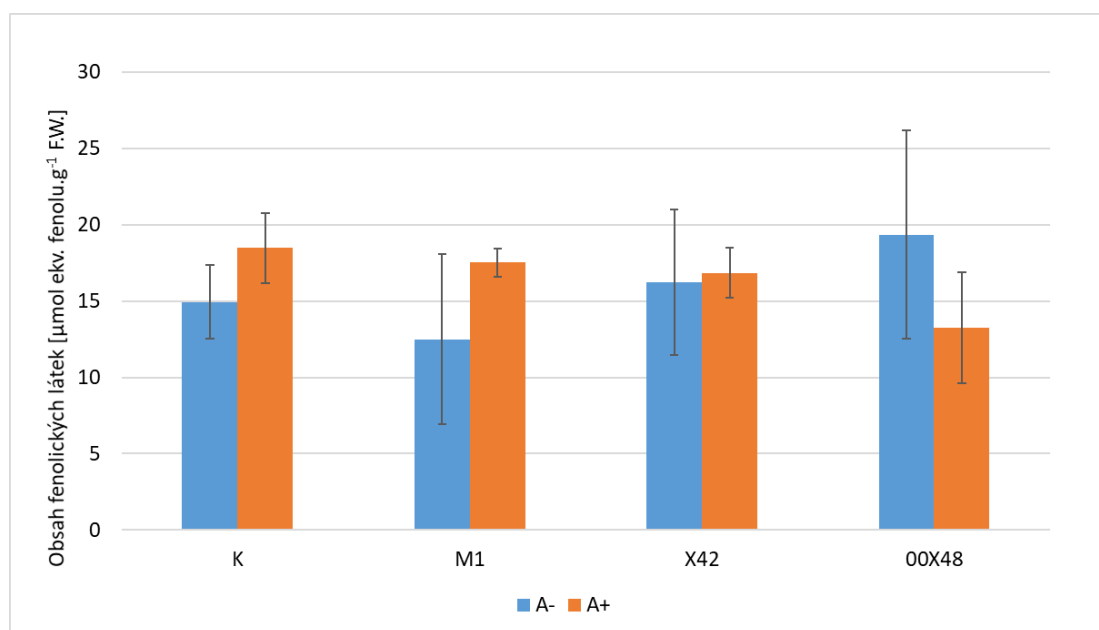


Obr. 16 Aktivita NADP-ME u rostlin rajčat, které byly ošetřeny *P. oligandrum* a rostlin rajčat ošetřených *P. oligandrum* a následně infikované *A. brassicicola*. Vzátaženo na 1g čerstvé hmotnosti listů (F.W.). Modré sloupce (A-) – rostliny pouze ošetřené *P. oligandrum*; Oranžové sloupce (A+) – rostliny ošetřené *P. oligandrum* a infikované *A. brassicicola*; K - bez ošetření *P. oligandrum*; M1 – komerčně dostupný izolát *P. oligandrum*; X42 – nový izolát *P. oligandrum*; 00X48 – nový izolát *P. oligandrum*.

5.3. Obsah fenolických látek a antioxidačních vlastností rostlin rajčete

Obsah fenolických látek v extraktech rostlin rajčete byl stanoven pomocí Folin-Ciocalteuova činidla.

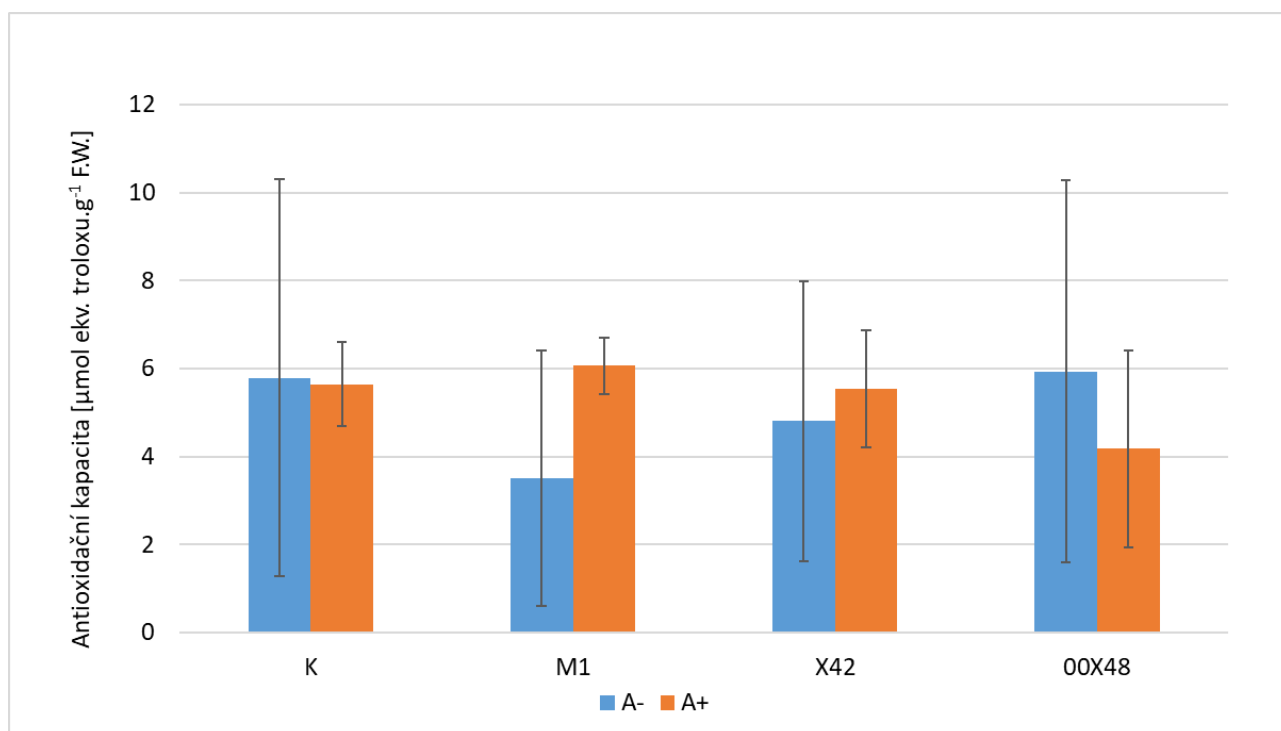
Na obrázku 17 pozorujeme, že ve srovnání s rostlinami bez ošetření K (A-) se obsah fenolických látek u rostlin ošetřených izoláty X42 (A-) a 00X48 (A-) navýšil. U rostlin ošetřených izolátem M1 (A-) byl obsah fenolických látek nižší o 16 % ve srovnání s rostlinami bez ošetření K (A-). Největší obsah fenolických látek byl naměřen u rostlin ošetřených izolátem 00X48 (A-), které měly o 30 % vyšší obsah fenolických látek oproti rostlinám bez ošetření K (A-). Obsah fenolických látek u rostlin infikovaných patogenem *A. brassicicola* je u rostlin bez ošetření K (A+) o 24 % vyšší než u neinfikovaných rostlin bez ošetření K (A-). U infikovaných rostlin ošetřených izolátem M1 (A+) došlo ke zvýšení obsahu fenolických látek o 40 % oproti neinfikovaným rostlinám ošetřených izolátem M1 (A-). Rostliny ošetřené izolátem X42 mají srovnatelné hodnoty fenolických látek. Kdežto u rostlin ošetřených izolátem 00X48 (A+) došlo ke snížení obsahu fenolických látek o 31 % vůči neinfikovaným rostlinám ošetřených izolátem 00X48 (A-).



Obr. 17 Obsah fenolických látek u rostlin rajčat, které byly ošetřeny *P. oligandrum* a rostlin rajčat ošetřených *P. oligandrum* a následně infikované *A. brassicicola*. Vzátaženo na 1g čerstvé hmotnosti listů (F.W.). Modré sloupce (A-) – rostliny pouze ošetřené *P. oligandrum*; Oranžové sloupce (A+) – rostliny ošetřené *P. oligandrum* a infikované *A. brassicicola*; K - bez ošetření *P. oligandrum*; M1 – komerčně dostupný izolát *P. oligandrum*; X42 – nový izolát *P. oligandrum*; 00X48 – nový izolát *P. oligandrum*

Pomocí metody DPPH byla zjištěna schopnost extraktů rostlin redukovat syntetické radikály DPPH na DPPH-H.

Z obrázku 18 je patrné, že rostliny ošetřené izolátem 00X48 (A-) měly srovnatelné hodnoty jako rostliny bez ošetření K (A-). Zatímco naměřené hodnoty rostlin ošetřené izolátem M1 (A-) byly nižší o 39 % oproti rostlinám bez ošetření K (A-), naměřené hodnoty pro rostliny ošetřené izolátem X42 (A-) se snížily o 16 % ve srovnání s rostlinami bez ošetření K (A-). U rostlin infikovaných patogenem *A. brassicicola* měly rostliny bez ošetření K (A+) srovnatelné hodnoty jako neinfikované rostliny bez ošetření K (A-). U rostlin ošetřené izolátem M1 (A+) došlo k nárůstu hodnot o 74 % oproti neinfikovaným rostlinám ošetřených izolátem M1 (A-). Naměřené hodnoty rostlin ošetřených izolátem X42 (A+) byly vyšší o 15 % ve srovnání s neinfikovanými rostlinami ošetřených izolátem X42 (A-). Kdežto naměřené hodnoty rostlin ošetřené izolátem 00X48 (A+) byly nižší o 29 % než neinfikované rostliny ošetřené izolátem 00X48 (A-).

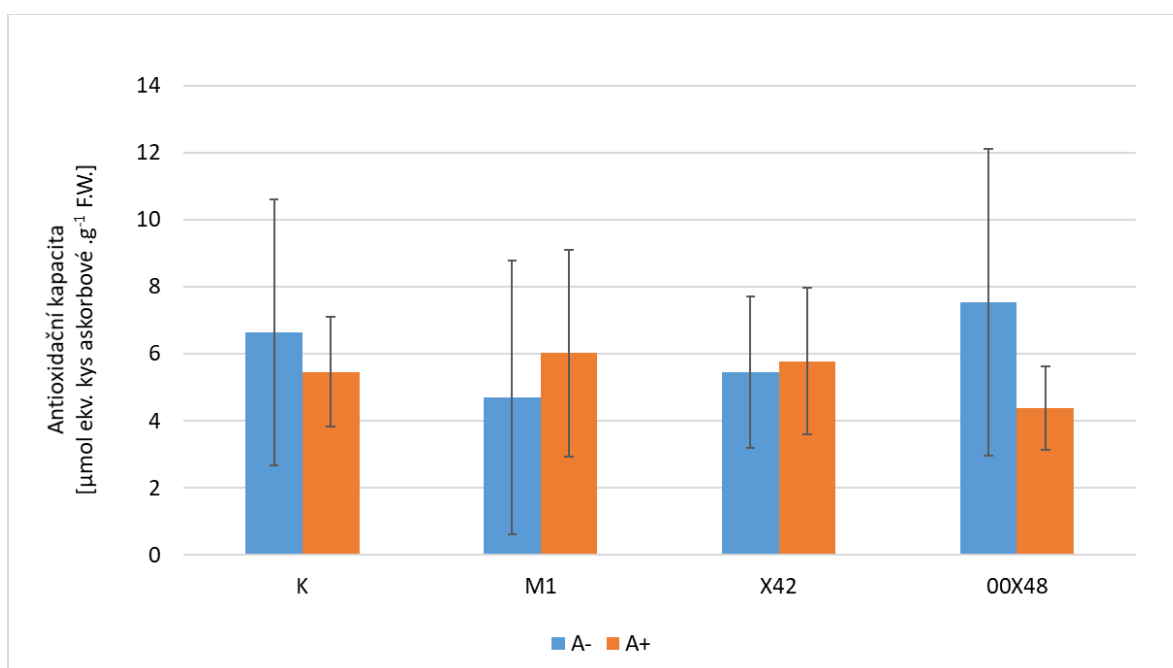


Obr. 18 Antioxidační kapacita odpovídající ekvivalentům troloxu u rostlin rajčat, které byly ošetřeny *P. oligandrum* a rostlin rajčat ošetřených *P. oligandrum* a následně infikované *A. brassicicola* Vztaženo na 1g čerstvé hmotnosti listů (F.W.). Modré sloupce (A-) ■ – rostliny pouze ošetřené *P. oligandrum*; Oranžové sloupce (A+) ■ – rostliny ošetřené *P. oligandrum* a infikované *A. brassicicola*; K – bez ošetření *P. oligandrum*; M1 – komerčně dostupný izolát *P. oligandrum*; X42 – nový izolát *P. oligandrum*; 00X48 – nový izolát *P. oligandrum*

Pomocí metody FRAP byla stanovena schopnost extraktů rostlin redukovat železité ionty.

Na obrázku 19 (str. 30) lze vidět, že naměřené hodnoty rostlin ošetřených izolátem M1 (A-) byly nižší o 29 % oproti rostlinám bez ošetření K (A-), naměřené hodnoty u rostlin ošetřených izolátem X42 (A-) se snížily o 18 % ve srovnání s rostlinami bez ošetření K (A-).

Zatímco naměřené hodnoty u rostlin ošetřené izolátem 00X48 byly vyšší o 14 % než u rostlin bez ošetření K (A-). Rostliny infikované patogenem *A. brassicicola* bez ošetření izolátem K (A+) měly nižší hodnoty o 17 % než rostliny bez ošetření izolátem K (A-). U rostlin ošetřených izolátem M1 (A+) došlo k nárůstu hodnot o 28 % oproti neinfikovaným rostlinám ošetřených izolátem M1 (A-). Naměřené hodnoty rostlin ošetřené izolátem X42 (A+) se navýšily o 7 % ve srovnání s neinfikovanými rostlinami ošetřených izolátem X42 (A-). Zatímco naměřené hodnoty rostlin ošetřené izolátem 00X48 (A+) byly nižší o 41 % oproti neinfikovaným rostlinám ošetřených izolátem 00X48 (A-).



Obr. 19 Antioxidační kapacita odpovídající ekvivalentům kyseliny askorbové u rostlin rajčat, které byly ošetřeny *P. oligandrum* a rostlin rajčat ošetřených *P. oligandrum* a následně infikované *A. brassicicola*. Vztaženo na 1g čerstvé hmotnosti listů (FW). Modré sloupce (A-) – rostliny pouze ošetřené *P. oligandrum*; Oranžové sloupce (A+) – rostliny ošetřené *P. oligandrum* a infikované *A. brassicicola*; K - bez ošetření *P. oligandrum*; M1 – komerčně dostupný izolát *P. oligandrum*; X42 – nový izolát *P. oligandrum*; 00X48 – nový izolát *P. oligandrum*

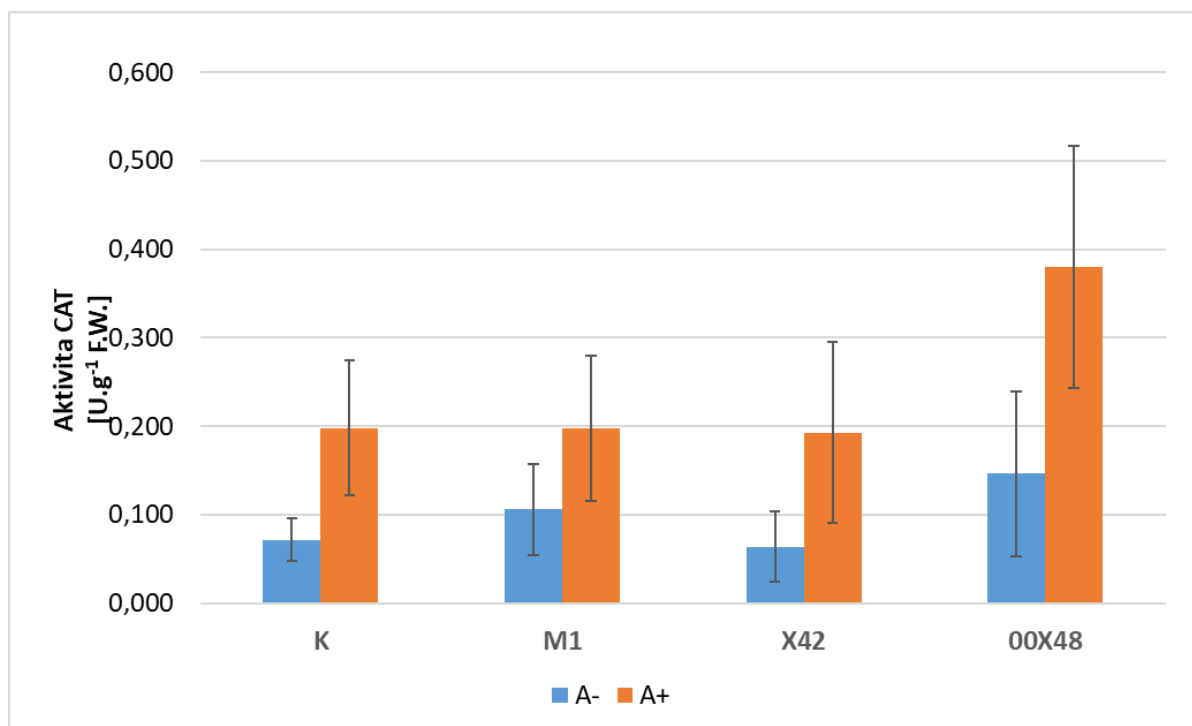
5.4. Aktivita antioxidačních enzymů v rostlinách rajčat

Antioxidační enzymy jsou součástí antioxidačního systému, který je velmi důležitý pro udržení homeostáze.

5.4.1. Aktivita katalasy

Na obrázku 20 (str. 31) je vidět pokles aktivity u rostlin ošetřených izolátem X42 (A-) o 11 % ve srovnání s rostlinami bez ošetření K (A-). Naproti tomu u rostlin ošetřených izolátem M1 (A-) a 00X48 (A-) došlo k zvýšení aktivity oproti rostlinám bez ošetření K (A-).

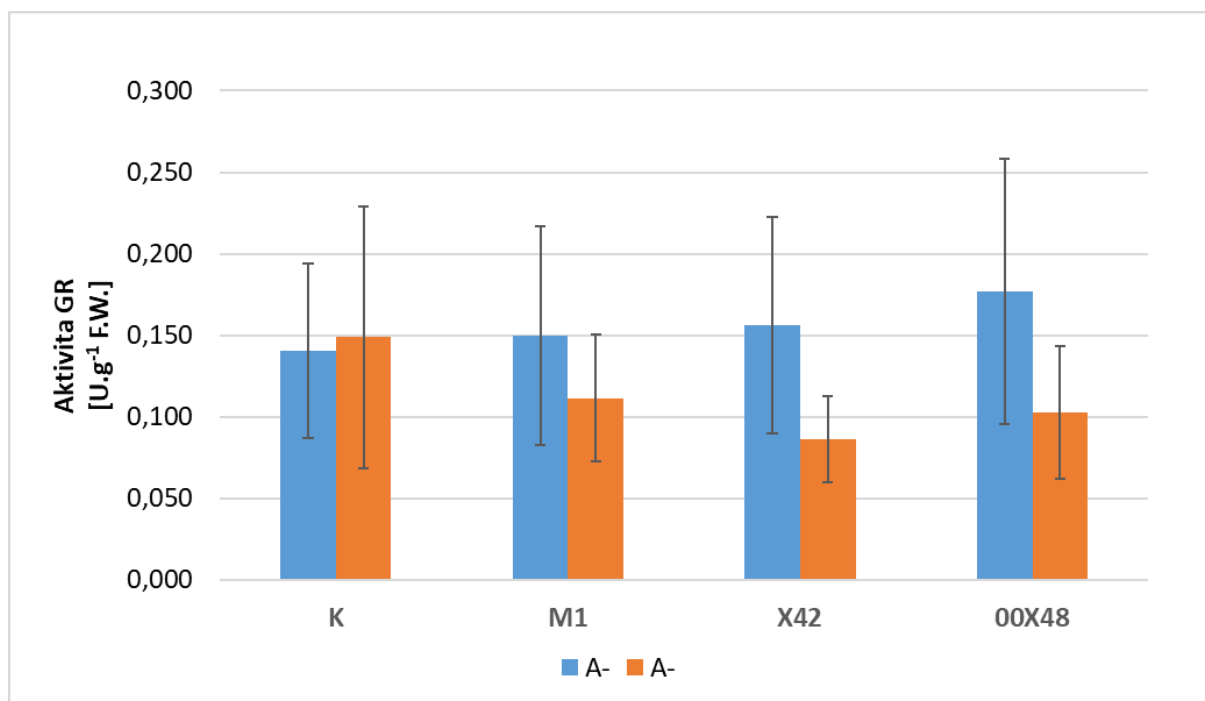
Všechny rostliny infikované *A. brassicicola* vykazovaly vyšší aktivitu CAT než neinfikované rostliny (A-). Největší zvýšení aktivity CAT byl zaznamenán u rostlin ošetřených izolátem 00X48 (A+), který byl větší o 160 % než neinfikované rostliny ošetřené izolátem 00X48 (A-).



Obr. 20 Aktivita CAT u rostlin rajčat, které byly ošetřeny *P. oligandrum* a rostlin rajčat ošetřených *P. oligandrum* a následně infikované *A. brassicicola*. Vztaheno na 1g čerstvé hmotnosti listů (F.W.). Modré sloupce (A-) ■ – rostliny pouze ošetřené *P. oligandrum*; Oranžové sloupce (A+) ■ – rostliny ošetřené *P. oligandrum* a infikované *A. brassicicola*; K – bez ošetření *P. oligandrum*; M1 – komerčně dostupný izolát *P. oligandrum*; X42 – nový izolát *P. oligandrum*; 00X48 – nový izolát *P. oligandrum*

5.4.2. Aktivita glutathionreduktasy

Na obrázku 21 (str. 32) je patrný nárůst aktivity GR u rostlin ošetřených pouze *P. oligandrum* (A-). Nejvýraznější zvýšení aktivity GR bylo zaznamenáno u rostlin ošetřených izolátem 00X48 (A-), který byl vyšší o 26 % oproti rostlinám bez ošetření K (A-). Infikované rostliny bez ošetření K (A+) měly srovnatelnou aktivitu GR s neinfikovanými rostlinami bez ošetření K (A-). Rostliny infikované *A. brassicicola* (A+) měly nižší aktivitu GR než rostliny neinfikované (A-).

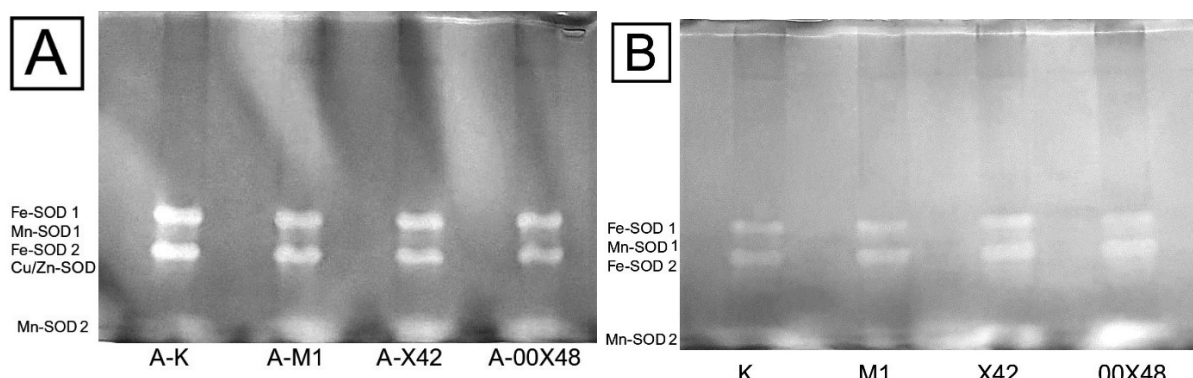


Obr. 21 Aktivita GR u rostlin rajčat, které byly ošetřeny *P. oligandrum* a rostlin rajčat ošetřených *P. oligandrum* a následně infikované *A. brassicicola*. Vztaženo na 1g čerstvé hmotnosti listů (F.W.). Modré sloupce (A-) ■ – rostliny pouze ošetřené *P. oligandrum*; Oranžové sloupce (A+) ■ – rostliny ošetřené *P. oligandrum* a infikované *A. brassicicola*; K – bez ošetření *P. oligandrum*; M1 – komerčně dostupný izolát *P. oligandrum*; X42 – nový izolát *P. oligandrum*; 00X48 – nový izolát *P. oligandrum*

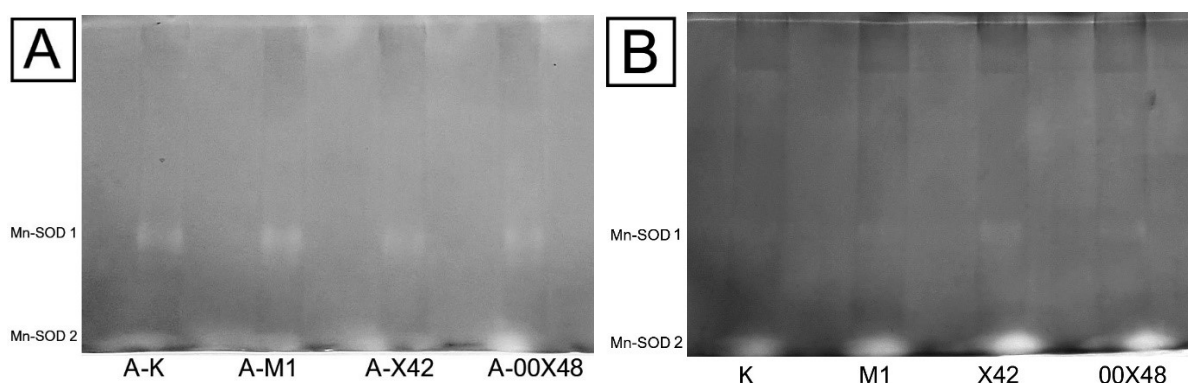
5.5. Aktivita superoxiddismutasy

Elektroforetickou separací za nativních podmínek byly odděleny isoenzymy SOD, jejichž aktivita byla následně detekována negativním barvením (viz Obr. 22 (str. 33)). Jednotlivé isoformy byly identifikovány pomocí inhibičních studií. Peroxid vodíku inhibuje isoenzymy Cu/Zn-SOD a Fe-SOD a tak byl detekována pouze isoforma Mn-SOD (viz Obr. 23 (str. 33)). Vlivem KCN byl inhibován pouze isoenzym Cu/Zn-SOD a detekovány byly isoenzymy Mn-SOD a Fe-SOD (viz Obr. 24 (str. 33)).

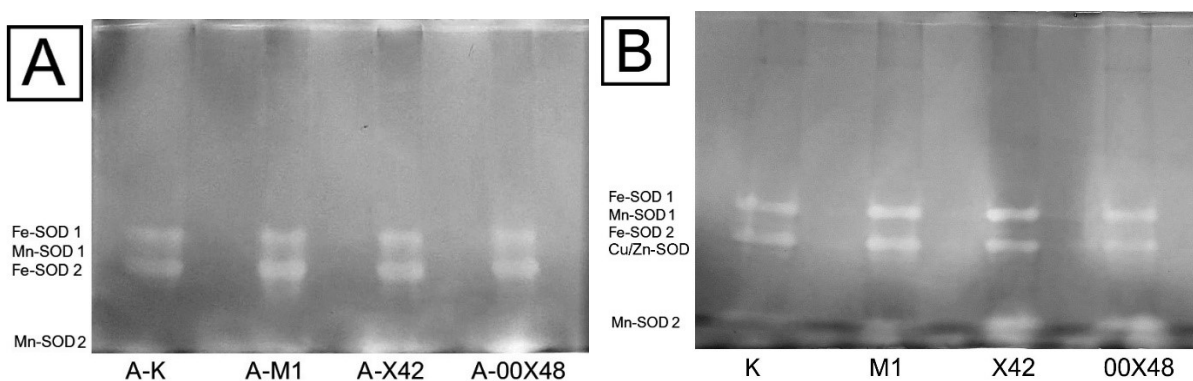
Denzitometrické vyhodnocení gelů bylo provedeno v programu GelAnalyzer 19.1. (Tab. 2, str.34). Vyšší intenzita, tedy aktivita, byla detekována v případě rostlin infikovaných patogenem *A. brassicicola*.



Obr. 22 Elektroforetická separace v 10 % gelu za nativních podmínek extraktů rostlin rajčat ošetřených *P. oligandrum* a infikovaných *A. brassicicola* a extraktů rajčat pouze ošetřených *P. oligandrum* (neinfikovaných). Následovala detekce isoenzymů SOD. Do jamek bylo nanášeno 45 μ g proteinů. **A** – rostliny rajčete ošetřené *P. oligandrum* a infikované *A. brassicicola*; **B** – rostliny rajčete pouze ošetřené *P. oligandrum*; K – bez ošetření *P. oligandrum*; M1 – komerčně dostupný izolát *P. oligandrum*; X42 – nový izolát *P. oligandrum*; 00X48 – nový izolát *P. oligandrum*



Obr. 23 Elektroforetická separace v 10 % gelu za nativních podmínek extraktů rostlin rajčat ošetřených *P. oligandrum* a infikovaných *A. brassicicola* a extraktů rajčat pouze ošetřených *P. oligandrum* (neinfikovaných). Následovala detekce isoenzymů Mn-SOD. Do jamek bylo nanášeno 45 μ g proteinů. **A** – rostliny rajčete ošetřené *P. oligandrum* a infikované *A. brassicicola*; **B** – rostliny rajčete pouze ošetřené *P. oligandrum*; K – bez ošetření *P. oligandrum*; M1 – komerčně dostupný izolát *P. oligandrum*; X42 – nový izolát *P. oligandrum*; 00X48 – nový izolát *P. oligandrum*



Obr. 24 Elektroforetická separace v 10 % gelu za nativních podmínek extraktů rostlin rajčat ošetřených *P. oligandrum* a infikovaných *A. brassicicola* a extraktů rajčat pouze ošetřených *P. oligandrum* (neinfikovaných). Následovala detekce isoenzymů Mn-SOD a Fe-SOD. Do jamek bylo nanášeno 45 μ g proteinů. **A** – rostliny rajčete ošetřené *P. oligandrum* a infikované *A. brassicicola*; **B** – rostliny rajčete pouze ošetřené *P. o.*; K – bez ošetření *P. oligandrum*; M1 – komerčně dostupný izolát *P. oligandrum*; X42 – nový izolát *P. oligandrum*; 00X48 – nový izolát *P. oligandrum*

Tab. 2 Denzitometrické vyhodnocení gelů (program GelAnalyzer 19.1.) elektroforetické separace v 10 % gelu za nativních podmínek extraktů rostlin rajčat ošetřených *P. oligandrum* a infikovaných *A. brassicicola* a extraktů rajčat pouze ošetřených *P. oligandrum* (neinfikovaných). Následovala detekce isoenzymů SOD. Do jamek bylo nanášeno 45 µg proteinů. **A** – rostliny rajčete ošetřené *P. oligandrum* a infikované *A. brassicicola*; **B** – rostliny rajčete pouze ošetřené *P. oligandrum*; **K** – bez ošetření *P. oligandrum*; **M1** – komerčně dostupný izolát *P. oligandrum*; **X42** – nový izolát *P. oligandrum*; **00X48** – nový izolát *P. oligandrum*

Relativní intenzita	A				B			
	A-K	A-M1	A-X42	A-00X48	K	M1	X42	00X48
Fe-SOD1	1699	1283	1410	1438	525	903	1260	567
Mn-SOD1	104	18	107	43	26	25	20	13
Fe-SOD2	1382	1128	1138	1100	599	679	863	343
Cu/Zn-SOD	22	14	53	10	11	18	13	17
Mn-SOD2	1481	1885	1935	1436	342	409	1270	1021

6. Diskuze

P. oligandrum patří mezi komerčně využívané organismy v oblasti biologické ochrany rostlin. V této práci byl sledován vliv infekce patogenem *A. brassicicola* na metabolismus rostlin rajčete jedlého po ošetření jejich semen novými izoláty *P. oligandrum*, které byly získány v rámci řešení projektu TAČR Zéta (TJ01000451). Mezi klíčové vlastnosti *P. oligandrum* patří jeho schopnost sekretovat hydrolytické enzymy, které narušují buněčné stěny fytopatogenních hub. Sekrece těchto enzymů a dalších látek jako jsou proteinové elicitory oligandrinu působí také v rostlině jako spouštěče obranných reakcí – syntézy fenolických látek a antioxidačních enzymů [54][50]. Analýza sekretomu nově nalezených izolátů *P. oligandrum* odhalila přítomnost široké škály exoglykosidas, proteas a fosfatas; dále volných aminokyselin, fenolických látek a tryptaminu [57].

Aktivita klíčového enzymu SDH pro syntézu fenolických látek nebyla v rámci jednotlivých skupin výrazně odlišná. Pouze rostliny ošetřené izolátem 00X48 vykazovaly mírné zvýšení oproti ostatním (Obr. 14, str. 25). Fenolické látky jsou díky své struktuře velkou mírou zodpovědné za antioxidační kapacitu, zejména zhášení nebezpečných reaktivních forem kyslíku (ROS). Antioxidační vlastnosti odpovídaly svým trendem obsahu fenolických látek. Jednotlivé experimentální skupiny se mezi sebou v těchto parametrech výrazně nelišily (obr. 17, str. 28; obr. 18, str. 29 a obr. 19, str. 30). Stejně výsledky byly získány pro analýzu rostlin řepky a infekci patogenem *Verticillium longisporum* [58]. Zvýšení produkce fenolických látek v reakci na infekci patogenem bude patrně časově závislé. V této práci odpovídají výsledky měření stavu rostlin po dvoutýdenní propagaci infekce, při sledování průběhu infekce v čase lze předpokládat změnu v obsahu těchto látek, a i antioxidační kapacity.

V této práci byla také sledována aktivita vybraných antioxidačních enzymů (CAT, GR, SOD), které obecně souvisí s oxidativním stresem a ochranou buněčných struktur. ROS také mohou sehrávat pozitivní roli v aktivní interakci s patogeny a spouštění signálních drah obranných reakcí. Snížení aktivity antioxidačních enzymů může tedy souviset přímo s obrannými reakcemi, naopak zvýšení aktivity antioxidačních enzymů znamená odstraňování ROS a ochranu proteinů a membránových lipidů před oxidací [59]. V případě enzymu CAT bylo sledováno významné zvýšení u všech skupin rostlin po infekci patogenem *A. brassicicola*, nejvyšší nárůst aktivity byl detekován po ošetření izolátem 00X48 (Obr. 20, str. 31). Na druhé straně aktivita GR se po infekci patogenem výrazně snížila (Obr. 21, str. 32). Jednotlivé izoenzymy SOD byly detekovány elektroforetickou separací za nativních podmínek. Ve všech skupinách rostlin byly pomocí inhibičních studií detekovány dvě Fe, dvě Mn a jedna Cu/Zn isoforma (obr. 22, obr. 23 a obr. 24, str. 33). Po infekci patogenem *A. brassicicola* byla aktivita SOD zvýšena ve všech experimentálních skupinách (Obr. 22, str. 33). Z denzitometrického stanovení (Tab. 2, str. 34) vyplývá, že nejvyšší aktivita SOD byla nalezena v případě infikovaných kontrolních rostlin. Systém antioxidačních enzymů a kapacity je ve svém působení velmi komplexní a bude vyžadovat stanovení dalších zapojených enzymů a látek (např. peroxidasy, obsah glutathionu, askorbátu), a také detekci obranných odpovědí rostlin v průběhu infekce.

Mezi další sledované enzymy patřily NADP-ME a G6PDH dehydrogenasy, které za stresových podmínek dodávají NADPH jednak pro biosyntetické reakce (např. syntéza mastných kyselin), jednak pro možnou hypersenzitivní reakci jako substrát pro NADPH oxidasu a také jako koenzym pro antioxidační enzym GR [60][44]. Za fyziologických podmínek je dostatečné množství NADPH zajišťováno fotosyntézou. Enzym NADP-ME vykázal významné zvýšení ve všech rostlinách ošetřených izoláty *P. oligandrum* po infekci *A. brassicicola* oproti kontrole (Obr. 16, str. 27). Aktivita G6PDH byla po napadení tímto patogenem významně zvýšena zejména v případě ošetření izolátem 00X48 (Obr. 15, str. 26).

Výsledky této práce rozšiřují znalosti o vlivu ošetření semen rostlin oomycetou *P. oligandrum* na metabolismus rostlin infikovaných patogenem *A. brassicicola*. V rámci udržitelného zemědělství je biologická ochrana perspektivním řešením a bude stále častěji využívanou variantou pro ochranu rostlin v porovnání s chemickými pesticidy.

7. Závěr

- Byl sledován vliv infekce patogenem *A. brassicicola* na metabolismus rostlin rajčete jedlého s důrazem na antioxidační systém po ošetření jejich semen izoláty *P. oligandrum*.
- Obsah fenolických látek a s ním spojená antioxidační kapacita zůstala nezměněna.
- Aktivita antioxidačních enzymů CAT a SOD, dehydrogenas NADP-ME a G6PDH byla po infekci patogenem *A. brassicicola* zvýšená ve všech skupinách experimentálních rostlin.
- Ošetření izolátem 00X48 vykazovalo relativně významné zvýšení aktivit SDH, G6PDH, NADP-ME a CAT po infekci patogenem *A. brassicicola* a lišilo se tak od ostatních izolátů.

8. Seznam použité literatury

- [1] LARYSZ, J. Rajče jedlé: Těž lilek rajče (*Solanum lycopersicum* L., 1753) [online]. 2016 [cit. 2020-06-12]. Dostupné z: <https://jan1212.webgarden.cz/rubriky/katalog-rostlin/lecive-byliny/rajce-jedle>
- [2] Kalorické tabulky. *Kaloricketabulky.cz* [online]. Dine4Fit [cit. 2020-06-10]. Dostupné z: <https://www.kaloricketabulky.cz/potraviny/rajcata>
- [3] FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistical database [online]. 2019 [cit. 2020-06-12]. Dostupné z: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>
- [4] BUCHTOVÁ, I. *Situační a výhledová zpráva zelenina*. Praha 1: Ministerstvo zemědělství, 2019. ISBN 978-80-7434-257-2. ISSN 1211-7692.
- [5] SEDLÁŘOVÁ, M., VAŠUTOVÁ, M., SEDLÁŘ J. Atlas houbových organismů: *Cladosporium fulvum* [online]. 2004-2007 [cit. 2020-06-12]. Dostupné z: <http://botany.upol.cz/atlas/system/gallery.php?entry=Cladosporium%20fulvum>
- [6] SEDLÁŘOVÁ, M., VAŠUTOVÁ, M., SEDLÁŘ J. Atlas houbových organismů: *Oidium lycopersici* [online]. 2004-2007 [cit. 2020-06-12]. Dostupné z: <http://botany.upol.cz/atlas/system/gallery.php?entry=Oidium%20lycopersici>
- [7] PESTNET, Pacific Pests and Pathogens. Cabbage black leaf spot. pestnet [online]. 2017 [cit. 2020-06-12]. Dostupné z: https://www.pestnet.org/fact_sheets/cabbage_black_leaf_spot_133.htm
- [8] KIRK, P.M., CANNON, P.F., WINTER, D.W., STALPERS J.A. *Dictionary of the Fungi*. 10th ed. 2010. ISBN 0-85199-826-7.
- [9] FERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, S., SADYŠ, M., SMITH, M. Potential sources of airborne *Alternaria* spp. spores in South-west Spain. *STOTEN*. 2015, 533, 165-176. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2015.06.031.
- [10] MEENA, M. a SAMAL, S. *Alternaria* host-specific (HSTs) toxins: An overview of chemical characterization, target sites, regulation and their toxic effects. *Toxicology Reports*. 2019, 6, 745-758. DOI: 10.1016/j.toxrep.2019.06.021. ISSN 2214-7500.
- [11] OKA, K., AKAMATSU, H., NAKAJIMA, H., KAWADA, T. a OTANI, H. Host-specific AB-toxin production by germinating spores of *Alternaria brassicicola* is induced by a host-derived oligosaccharide. *Physiol. Molecul. Plant Pathol.* 2005, 66, 12-19. DOI: 10.1016/j.pmpp.2005.03.005. ISSN 0885-5765.
- [12] NOWICKI, M., NOWAKOWSKA, M., NIEZGODA, A. a KOZIK, E. *Alternaria* Black spot of crucifers: symptoms, importance of disease, and perspectives of resistance breeding. *Vegetable Crops Res. Bul.* 2012, 76, 5-19. DOI: 10.2478/v10032-012-0001-6. ISSN 1898-7761.
- [13] AMEIN, T., WRIGHT, S.A.I., WIKSTRÖM, M., KOCH, E. Evaluation of non-chemical seed treatment methods for control of *Alternaria brassicicola* on cabbage seeds. *J. Plant Diseases Prot* [online]. 2011, 214–221 [cit. 2020-06-10]. DOI: 10.1007/bf03356406. ISSN 1861-3837.
- [14] CHO, Y. How the necrotrophic fungus *alternaria brassicicola* kills plant cells remains an enigma. *EC*. 2015, 14, 335–344. DOI: 10.1128/EC.00226-14.
- [15] JGI, MycoCosm. *Alternaria brassicicola*. *MycoCosm* [online]. [cit. 2020-06-12]. Dostupné z: <https://mycocosm.jgi.doe.gov/Altbr1/Altbr1.home.html>
- [16] KEMMIT, G.M. Early blight of potato and tomato. *Plant Health Instr.* 2012. DOI: 10.1094/PHI-I-2002-0809-01. ISSN 1935-9411.
- [17] CIPOLLINI, D., WALTERS, D., VOELCKEL, C. Costs of resistance in plants: from theory to evidence. *Annu. Plant Rev.* online [online]. Wiley, 2014, 47, 263–307 [cit. 2020-06-13]. DOI: 10.1002/9781119312994.apr0512. ISSN 26393832.
- [18] YEATS, T. H., ROSE, J. K. C. The formation and funct. of plant cuticles. *Plant Physiol.* 2013, 163, 5-20. DOI: 10.1104/pp.113.222737. ISSN 0032-0889.
- [19] COWAN, M. M. Plant Products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.* 1999., 12, 564-582. DOI: 10.1128/CMR.12.4.564.
- [20] BENHAMOU, N. Elicitor-induced plant defence pathways. *Trends Plant Sci.* 1996., 1, 233-240. DOI: 10.1016/1360-1385(96)01-86909.
- [21] POSPÍŠIL, P. Production of reactive oxygen species by photosystem ii as a response to light and temperature stress. *Front. Plant Sci.* 2016., 7, 1-12. DOI: doi.org/10.3389/fpls.2016.01950.
- [22] DAS, K., ROYCHOUDHURY, A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants, *Front. Environ. Sci.* 2014, 2, 1-13. DOI: doi.org/10.3389/fenvs.2014.00053.
- [23] MUR, L. A., KENTON J. P., LLOYD, A. J., OUGHAM, H. PRATS, E. The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *J Exp Bot.* 2008, 59, 501-520. DOI: 10.1093/jxb/erm239.

- [24] HASE, S., TAKAHASHI, S., TAKENAKA, S., NAKAHO, K. Involvement of jasmonic acid signalling in bacterial wilt disease resistance induced by biocontrol agent *Pythium oligandrum* in tomato. *Plant Pathol.* 2008, 57, 870-876. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2008.01858.x. ISSN 1365-3059.
- [25] VALLAD, G. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Sci.* 2004, 44, 1920-1934. DOI: 10.2135/cropsci2004.1920.
- [26] FAROOQ, M. A., NIAZI, A. K., AKHTAR, J., FAROOQ, M. Acquiring control: the evolution of ROS-induced oxidative stress and redox signaling pathways in plant stress responses. *Plant Physiol Biochem.* 2019, 141, 353-369. DOI: 10.1016/j.plaphy.2019.04.039.
- [27] POTTERS, G., GARA, L., ASARD, H., NELEHOREMANS, N. Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime? *Plant Physiol. Biochem.* 2002, 40, 537-548. DOI: 10.1016/S0981-9428(02)01414-6.
- [28] DEISSEROTH, A., DOUNCE, A. L. Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. *Physiol. Rev.* 1970, 50, 319-375. DOI: 10.1152/physrev.1970.50.3.319.
- [29] MATOUŠKOVÁ, M., RUTTKAY-NEDECKÝ, B., KIZEK, R. Antioxidační enzymy - biochemické markery oxidačního stresu. *J. Metallomics Nanotech.* 2014, 3, 53-56. ISSN 2336-3940.
- [30] AKERBOOM, T. P., BILZER, M., SIES, H. The relationship of biliary glutathione disulfide efflux and intracellular glutathione disulfide content in perfused rat liver. *J Biol Chem.* 1982, 257, 4248-4252.
- [31] NEUBAUER, C., YAMAMOTO, H. Y. Membrane barriers and Mehler-peroxidase reaction limit the ascorbate available for violaxanthin de-epoxidase activity in intact chloroplasts. *Photosynth Res.* 1994, 39, 137-147. DOI: 10.1007/BF00029381.
- [32] IGAMBERDIEV, C. SEREGÉLYES, A. U., MANAC, H N., HILL, R. D. NADH-dependent metabolism of nitric oxide in alfalfa root cultures expressing barley hemoglobin. *Planta.* 2004, 219, 95-102. DOI: 10.1007/s00425-003-1192-3.
- [33] ALSCHER, R. G. Biosynthesis and antioxidant function of glutathione in plants. *Physiol Plant.* 1989, 77, 457-64. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1989.tb05667.x.
- [34] MAEDA, H., DUDAREVA, N. The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2012, 63, 73-105. DOI: 10.1146/annurev-arplant-042811-105439.
- [35] TZINA, V., GALILI, G. The biosynthetic pathways for shikimate and aromatic amino acids in *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis Book.* 2010, 8, 1-18. DOI: 10.1199/tab.0132.
- [36] MUIR, R. M., IBÁÑEZ, A. M. a URATSU, S. L. Mechanism of gallic acid biosynthesis in bacteria (*Escherichia coli*) and walnut (*Juglans regia*). *Plant Mol Biol.* 2011, 75, 555–565. DOI: doi.org/10.1007/s11103-011-9739-3.
- [37] HÝSKOVÁ, V., BĚLONOŽNÍKOVÁ, K., ŠMERINGAIOVÁ, I., KAVAN, D., RYŠLAVÁ, H.: Product and phenylpropanoid inhibition study of parsley shikimate dehydrogenase, v přípravě 2020.
- [38] BIAŁA, W., JASIŃSKI, M. The phenylpropanoid case – It is transport that matters. *Front. Plant Sci.* 2018, 9, 1-8. DOI: 10.3389/fpls.2018.01610.
- [39] PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* 2000, 63, 1035–1042. DOI: 10.1021/np9904509.
- [40] CUSHNIE, T.P.T., LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2006, 26, 343-356. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002.
- [41] HELDT, H. W., PIECHULLA, B., HELDT, F. *Plant Biochemistry*. 4. USA: Academic Press, ISBN 978-0-12-384986-1.
- [42] DETARSIO, E., WHEELER, M.C.G., BERMÚDEZ, V.A.C., ANDREO, C.S., DRINCOVICH, M.F. Maize C4 NADP-malic enzyme. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 13757-13764. DOI: 10.1074/jbc.M212530200.
- [43] CASATI, P., DRINCOVICH, M.F., EDWARDS, G.E. Malate metabolism by NADP-malic enzyme in plant defense. *Photosynth Res.* 1999, 61, 99–105. DOI: doi.org/10.1023/A:1006209003096.
- [44] DOUBNEROVÁ, V., RYŠLAVÁ, H. NADP-dependent enzymes and abiotic stress. HARYANA, N. a S. PUNJ. *Abiotic Stress: New Res.* UK: Nova Sci Pub, 2012, s. 57-98. ISBN 1619421976.
- [45] HÝSKOVÁ, V., PLISKOVÁ, V., ČERVENÝ, V., RYŠLAVÁ H. NADP-dependent enzymes are involved in salt and hypoosmotic stress in cucumber. *Gen. Physiol. Biophys.* 2017, 36, 247-258. DOI: 10.4149/gpb_2016053.
- [46] TAKENAKA, S. Studies on biological control mechanisms of *Pythium oligandrum*. *J. General Plant Pathol.* 2015, 81, 466-469. DOI: 10.1007/s10327-015-0620-0. ISSN 1345-2630.
- [47] DRECHSLER, C. Some new species of *Pythium*. *JSTOR.* 1930, 20, 398-418.
- [48] BENHAMOU, N., LE FLOCH, G., VALLANCE, J. *Pythium Oligandrum*: An Example of Opportunistic Success. *Microbiol.* 2012, 158, 2679-2694. DOI: 10.1099/mic.0.061457-0. ISSN 1465-2080.
- [49] HORNER, N. R., GRENVILLE-BRIGGS, L. J., WEST, P. The oomycete *Pythium oligandrum* expresses putative effectors during mycoparasitism of phytophthora infestans and is amenable to transformation. *Fungal Biol.* 2012, 116, 24-41. DOI: 10.1016/j.funbio.2011.09.004. ISSN 1878-6146.

- [50] GERBORE, J., VALLANCE J., YACOUB A. Characterization of *Pythium oligandrum* populations that colonize the rhizosphere of vines from the bordeaux region. *FEMS Microbiol Ecol.* 2014, 90, 153-167. DOI: 10.1111/1574-6941.12380. ISSN 1574-6941.
- [51] FROST, C. J., MESCHER, M. C., CARLSON, J. E., MORAES, C. M. Plant defense priming against herbivores: getting ready for a different battle. *Plant Physiol.* 2008, 146, 818-824. DOI: 10.1104/pp.107.113027.
- [52] CONRATH, U., PIETERSE, C. M. J., MAUCH-MANI, B. Priming in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci.* 2002, 7, 210-216. DOI: 10.1016/s1360-1385(02)02244-6.
- [53] WALTERS, D., NEWTON, A.C., LYON, G. Induced resistance for plant defence [online]. Blackwell Publishing, 2007, s. 143–156 [cit. 2020-06-10]. ISBN 978-0-470-99597-6.
- [54] MASUNAKA, A., SEKIGUCHI, H., TAKAHASHI, H. TAKENAKA, S. Distribution and expression of elicitor-like protein genes of the biocontrol agent *Pythium oligandrum*. *J. Phytopathol.* 2010, 158, 417–426. DOI: 10.1111/j.1439-0434.2009.01641.x.
- [55] PICARD, K., PONCHET, M., BLEIN, J.P., REY, P., TIRILLY, Y., BENHAMOU, N. Oligandrin. a proteinaceous molecule produced by the mycoparasite *Pythium oligandrum* induces resistance to *Phytophthora parasitica* infection in tomato plants. *Plant Physiol.* 2000, 124, 379–395. DOI: 10.1104/pp.124.1.379.
- [56] BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976, 72, 248-254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- [57] BĚLONOŽNÍKOVÁ, K., VAVEROVÁ, K., VANĚK, T., KOLAŘÍK, M., KŘÍŽEK, T., ČOKRTOVÁ, K., ŠTÍPEK, A., HÝSKOVÁ, V., RYŠLAVÁ, H.: Novel insights into *Pythium* strains metabolism, *Applied Microbiol. Biotech*, 2020.
- [58] VAVEROVÁ, K. Vliv moření semen řepky olejné oomycetou *Pythium oligandrum* na metabolismus rostliny. Praha, 2020. Diplomová práce. Přf UK
- [59] SPOUSTOVÁ, P., HÝSKOVÁ V., MÜLLER K., SCHNABLOVÁ R., RYŠLAVÁ H. Tobacco susceptibility to potato virus YNTN infection is affected by grafting and endogenous cytokinin content. *Plant Sci.* 2015, 235, 25-36. DOI: 10.1016/j.plantsci.2015.02.017. ISSN 0168-9452...
- [60] DOUBNEROVÁ, V., RYŠLAVÁ, H. What can enzymes of C4 photosynthesis do for C3 plants under stress? *Plant Sci.* 2011, 180, 575-583. DOI: 10.1016/j.plantsci.2010.12.005.

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

[illegible]